

P. Wildmeister
Mainz 1970

Aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Leitung: Prof. Dr. W. Thoenes)

Enzymhistochemische und disk-elektrophoretische
Untersuchung benigner und maligner Dickdarmtumoren
des Menschen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Peter Wildmeister
aus Düsseldorf
Mainz 1978

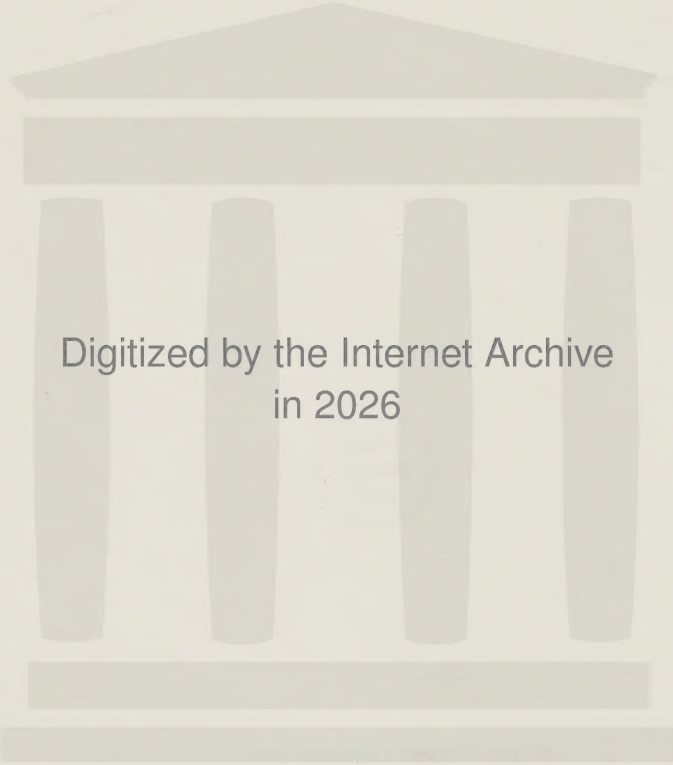


FACHBEREICHSDKAN: PROFESSOR DR. R. WOLF

1. GUTACHTER: PROFESSOR DR. P. HÖHN

2. GUTACHTER: PROFESSOR DR. K. PAULINI

Meiner lieben Frau gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Einteilung und Morphologie der epithelialen Dickdarmtumoren	1
1.1.1. Die gutartigen epithelialen Dickdarmtumoren (Polypen)	1
1.1.1.1. Hyperplastische Polypen	2
1.1.1.2. Adenomatöse und villöse Polypen (sog. neoplastische Polypen)	2
1.2. Die kausale und formale Pathogenese der Dickdarmcarcinome	3
1.3. Morphologie der Dickdarmcarcinome	4
1.4. Zielrichtung der vorliegenden Arbeit	6
1.5. Funktion der histochemisch und disk - elektro-phoretisch untersuchten Enzyme unter besonderer Berücksichtigung der Dickdarmschleimhaut	6
1.5.1. Alkalische Phosphatase	7
1.5.2. Saure Phosphatase	8
1.5.3. Laktat - Dehydrogenase	8
1.5.4. Malat - Dehydrogenase	9
2. Material und Methodik	10
2.1. Untersuchungsgut	10
2.2. Untersuchungsmethoden	11
2.2.1. Lichtmikroskopie	11
2.2.2. Enzymhistochemie	11

	Seite
2.2.2.1.	Alkalische Phosphatase 11
2.2.2.2.	Saure Phosphatase 12
2.2.2.3.	Laktat - Dehydrogenase 14
2.2.2.4.	Malat - Dehydrogenase 15
2.2.3.	Disk - Elektrophorese 16
2.2.3.1.	Aufarbeitung der Gewebeproben 16
2.2.3.2.	Durchführung der Elektrophorese und Anfärbung der Gele 17
2.2.3.2.1.	Alkalische Phosphatase 17
2.2.3.2.2.	Saure Phosphatase 18
2.2.3.2.3.	Laktat - Dehydrogenase 20
2.2.3.2.4.	Malat - Dehydrogenase 21
2.2.3.3.	Kontrolluntersuchungen mit Hemmsubstanzen 23
2.2.4.	Durchführung der Elektrophorese 23
3.	Ergebnisse 26
3.1.	Ergebnisse der histochemischen Untersuchungen 26
3.1.1.	Alkalische Phosphatase 26
3.1.2.	Saure Phosphatase 27
3.1.3.	Laktat- und Malat - Dehydrogenase 28
3.2.	Ergebnisse der disk-elektrophoretischen Untersuchungen 29
3.2.1.	Alkalische Phosphatase 29
3.2.2.	Saure Phosphatase 30
3.2.3.	Laktat - Dehydrogenase 31

		Seite
3.2.4.	Malat - Dehydrogenase	31
4.	Diskussion	32
5.	Zusammenfassung	38
6.	Literaturverzeichnis	41
7.	Lebenslauf	55

ENZYMHISTOCHEMISCHE UND DISK - ELEKTROPHORETISCHE
UNTERSUCHUNG BENIGNER UND MALIGNER DICKDARMTU-
MOREN DES MENSCHEN

1. Einleitung

1.1. Einteilung und Morphologie der epithe-
lialen Dickdarmtumoren

1.1.1. Die gutartigen epithelialen Dickdarmtumoren
(Polypen):

Mit über 90% stehen die Polypen an erster Stelle aller gutartigen Dickdarmtumoren (OTTO, 1976), wobei im Sektionsgut bei 50 - 70 % der Fälle Polypen der Dickdarmschleimhaut beobachtet werden sollen (MARTIN u. SUTTON, 1965; POTET u. SAULLARD, 1971).

Die Klassifizierung der Polypen basiert auf morphologischen Kriterien, die prognostische Rückschlüsse zulassen. Nach MORSON u. BUSSEY (1970) können die Polypen des Dickdarms wie folgt eingeteilt werden:

- a) Unklassifizierbare Polypen: Hyperplastische Polypen
- b) Neoplastische Polypen: Adenomatöse Polypen, adenomatös - villöse Polypen und villöse Polypen
- c) Hamartomatöse Polypen: Juvenile Polypen
- d) Entzündliche Polypen

Die Polypen der Gruppe c und d sollen im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter erörtert werden, da sie keine Rolle bei der Entstehung der Dickdarmcarcinome spielen.

Bei den Polypenträgern dominierte das männliche Geschlecht,

wobei die Inzidenz der Polypen mit dem Lebensalter korreliert (MORSON u. BUSSEY, 1970). Der Häufigkeitsgipfel der Darmtumoren liegt bei 58,1 Jahren (MORSON, 1974).

1.1.1.1. Hyperplastische Polypen

Die sog. hyperplastischen Polypen sind diejenigen Polypen, die am häufigsten im Dickdarm beobachtet werden (MORSON, 1962 a+b; MORSON u. BUSSEY 1970; LANE u. Mit., 1971). Nach WIEBECKE u. Mit. (1974) und HAYASHI u. Mit. (1974) besitzen die hyperplastischen Polypen eine normale an der Kryptenbasis lokalisierte - jedoch verbreiterte - Proliferationszone mit einer regelrechten Differenzierung der Epithelzellen. Dies bedeutet, daß die Auffaltung der Dickdarmschleimhaut bei den hyperplastischen Polypen durch eine " Überproduktion " weitgehend normal differenzierter Epithelzellen verursacht wird.

Nach MORSON u. BUSSEY (1970) und LANE u. Mit. (1971) sollen aus hyperplastischen Polypen keine adenomatösen Polypen oder Carcinome hervorgehen. Dies würde bedeuten, daß hyperplastische Polypen als absolut gutartig anzusehen sind.

1.1.1.2. Adenomatöse und villöse Polypen (sog. neoplastische Polypen)

Nach MORSON (1974) sind 75% der neoplastischen Polypen adenomatöse Polypen und 9,7% villöse Polypen. Die übrigen neoplastischen Polypen (15,3%) sind adenomatöse Polypen, die oberflächlich villöse Strukturen aufweisen - also Mischformen aus adenomatösen und villösen Polypen. Man spricht von adenomatös - villösen Polypen.

Human - pathogenetisch betrachtet, entstehen die neoplastischen Polypen im Dickdarm dadurch, daß in einem umschriebenen Bezirk

der Kryptenzone das Epithel auch in den apikalen Kryptenanteilen - also außerhalb der eigentlichen Proliferationszone - seine Proliferationsfähigkeit beibehält. Dies bedeutet, daß unvollständig differenzierte, sich noch teilende Epithelzellen an die Schleimhautoberfläche gelangen (WIEBECKE u. Mit., 1969; KAYE u. Mit., 1971; LIPKIN, 1974; DESCHNER u. Mit., 1975). Wenn nun die Epithelneubildungsrate die Epitheldesquamationsrate übertrifft, erfolgt die Ausbildung eines polypösen Tumors ("phase 2 of proliferative lesion" - LIPKIN, 1974).

1.2. Die kausale und formale Pathogenese der Dickdarmcarcinome

Ausgedehnte geographisch-pathologische und sozio-ökonomische Studien sprechen dafür, daß alimentäre Faktoren für die hohe Inzidenz der Darmtumoren (ca. 15% sämtlicher Tumoren) in Nordeuropa und Nordamerika verantwortlich sein müssen, da in Regionen mit anderen Lebensbedingungen (Afrika, Asien, Südamerika) Darmtumoren nur selten zu beobachten sind (HAENSZEL u. Mit., 1973; BERG u. HOWELL, 1974).

Als Ergebnis epidemiologischer Studien zeigt sich eine Koinzidenz zwischen der Höhe des Fettanteils in der Nahrung sowie in dem Fleischverbrauch einerseits und dem Auftreten der Darmtumoren andererseits (Arbeitsgruppe um WYNDER, 1974; u.a.). Die Höhe des Fettanteils in der Nahrung wiederum korreliert streng mit der Zusammensetzung und Konzentration der Cholesterin- und Gallensäuren - Metaboliten sowie bestimmter Fettsäuren im Darmlumen (REDDY, 1975; SPERRY u. Mit., 1976), von denen einige in Verdacht stehen, eine carcinogene Wirkung zu besitzen (HILL, 1974; COOMBS u. Mit., 1973; u.a.). Da der Fettgehalt in der Nahrung einen großen Einfluß auf die Zusammensetzung der intestinalen Flora hat (WYNDER u. REDDY, 1973), besteht auch die Möglichkeit, daß das terminale Carcinogen indirekt durch eine bakterielle Metabolisierung der Gallensäure- und Cholesterinabbauprodukte ent-

steht (HILL, 1974).

Im Zusammenhang mit dem Problem bzw. der Fragestellung, ob die Adenocarcinome des Dickdarms auf dem Boden von Adenomen entstehen oder ob sich derartige Carcinome ohne adenomatöse Vorstufen ausbilden (sog. " de novo carcinome ") bestanden lange Zeit kontroverse Meinungen (Übersicht: OTTO, 1976). Durch subtile histologische Untersuchungen an menschlichen Biopsie- und Resektionspräparaten konnte die Arbeitsgruppe um MORSON (1974), MUTO u. Mit. (1975) u.a. nachweisen, daß sich mindestens 50% der Adenocarcinome des Dickdarms aus Adenomen entwickeln. Der Beweis einer " Polyp-Carcinom-Sequenz " wird zusätzlich durch die experimentellen Untersuchungen von OTTO u. Mit. (1976) und HÜHN (1977) gestützt, die durch Applikationen chemischer Carcinogene Darmcarcinome erzeugten, deren Manifestation häufig ein " Polypen-Studium " vorausging.

1.3. Morphologie der Dickdarmcarcinome

Etwa 80% der Dickdarmcarcinome sind im Rektum und Colon sigmoideum lokalisiert (SHEPHERD u. JONES, 1971; ALKEN u. UNGEHEUER, 1974). Makroskopisch können im wesentlichen drei Carcinomformen unterschieden werden:

- a) Polypöse (exophytische) Carcinome
- b) Exulzerierte (geschwürig zerfallende) Carcinome
- c) Diffus infiltrierende Carcinome (Linitis plastica)

Histologisch lassen sich die folgenden Carcinomformen im Dickdarm unterscheiden:

- a) Adenocarcinome
- b) Adenocarcinome mit Schleimbildung (sog. Gallertcarcinome)
- c) Solide Carcinome mit Schleimbildung (sog. Siegelringzellcarcinome)

- d) Solide (undifferenzierte) Carcinome: Carcinoma solidum scirrhosum simplex und medullare
- e) Seltene Carcinome: Adeno-Akanthome, Plattenepithelcarcinome

Über 80% der Dickdarmcarcinome sind Adenocarcinome (BOKEL-MANN, 1975), die nach BUSSEY (1968) nochmals in hochdifferenzierte, mittelgradig differenzierte und weitgehend undifferenzierte Adenocarcinome untergliedert werden können.

Die Gallertcarcinome sind sozusagen eine morphologische Variante der Adenocarcinome und besitzen makroskopisch ein glasig - transparentes Aussehen. Ihre Häufigkeit in der Gesamtzahl der Dickdarmcarcinome soll 10 - 15% betragen (MORSON, 1974).

Siegelringzellcarcinome kommen im Dickdarm nur selten vor. Ihre Häufigkeit wird allenfalls auf 2% aller Dickdarmcarcinome veranschlagt.

Auch die soliden Carcinome gehören zu den seltenen Tumoren des Dickdarms. Ihre Häufigkeit wird allenfalls mit 2% angegeben.

Von der histologischen Differenzierung der Dickdarmcarcinome können durchaus Rückschlüsse auf die Prognose gezogen werden. Bei den Adenocarcinomen beträgt die 5 - Jahresheilung bei gut differenzierten Tumoren 80%, bei mittelgradig differenzierten Tumoren 60% und bei weitgehend entdifferenzierten Tumoren nur noch 25% (vergl. OTTO, 1976). Die schleimbildenden Adenocarcinome und soliden Carcinome haben eine schlechte Prognose, wobei die 5 - Jahresheilungsrate bei Siegelringzellcarcinomen mit 5% angegeben wird (WOLFMAN u. Mit., 1957).

1.4. Zielrichtung der vorliegenden Arbeit

Spiegelbild der spezifischen Funktion der Dickdarmschleimhaut ist die qualitative und quantitative Differenzierung des intermediären Zellstoffwechsels, dessen biochemische Reaktionen von Enzymen katalysiert werden. Um einen Einblick in das Enzymmuster und dessen Veränderungen in den Tumorzellen zu vermitteln, wurden vier Enzyme histochemisch untersucht:

- a) Enzyme des Transportes und des Zellkatabolismus (alkalische und saure Phosphatase)
- b) ein Enzym der Glykolyse (Laktat-Dehydrogenase) und
- c) ein Enzym des Zitronensäure-Zyklus (Malat-Dehydrogenase)

Neben der intrazellulären Lokalisation und Aktivitätshöhe der einzelnen Enzyme - soweit histochemisch erfaßbar - sollen durch elektrophoretische Auftrennung von Isoenzymen qualitative Enzymveränderungen registriert werden. Hierbei interessiert vor allem die Frage, ob in den Tumoren ein in Richtung des fetalen Zustandes transformiertes Isoenzymmuster zu beobachten ist, wie dies in experimentell induzierten Tumoren (aber auch in menschlichen Tumoren) nachgewiesen und auch diagnostisch ausgewertet werden kann. Deshalb werden in Homogenaten der normalen Dickdarmschleimhaut sowie in Homogenaten benignen und malignen, epithelialen Dickdarmtumoren vier Enzyme (alkalische, saure Phosphatase, Laktat - Malat - Dehydrogenase) in ihre Unterfraktionen bzw. Isoenzyme aufgetrennt.

1.5. Funktion der histochemisch und disk-elektrophoretisch untersuchten Enzyme unter besonderer Berücksichtigung der Dickdarmschleimhaut

1.5.1. Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase (a.Ph.) umfaßt eine Gruppe heterogen strukturierter Enzymmoleküle, die die Hydrolyse einer großen Zahl von Phosphomonoestern und Pyrophosphaten katalysiert. Diese Enzymgruppen besitzen weiterhin phosphorylierende und transphosphorylierende Eigenschaften (HARKNESS, 1968). Die einzelnen Fraktionen der a.Ph. können aufgrund der unterschiedlichen Hitzestabilität, immunologischen, elektrophoretischen und biochemischen Eigenschaften getrennt werden (MOSS, 1975). Das Enzym ist vor allem in Zellmembranen lokalisiert, in denen aktive Transportvorgänge ablaufen, z.B. Bürstensaum der Enterozyten und der Epithelzellen der proximalen Nierentubuli, in der Membran im Bereich des Gallepols der Hepatozyten, in den Endothelzellen der Kapillaren u. a.

Die im Bürstensaum der Enterozyten lokalisierte Aktivität der a.Ph. läßt sich mit L-Phenylalanin selektiv hemmen (WATANABE u. FISHMAN, 1964). Mit zytochemischen Methoden kann die a.Ph. zusätzlich noch in der lateralen und basalen Zellmembran, im Golgifeld, im glatten endoplasmatischen Reticulum und in Lysosomen nachgewiesen werden (HUGON u. BORGERS, 1966 u. 1968). Im Darm nimmt die Aktivität der a.Ph. von proximal nach distal kontinuierlich ab und ist im Oberflächenepithel des Ileum und des Dickdarms nicht mehr bzw. nur noch in schwacher Aktivität nachweisbar (HARRISON u. WEBSTER, 1971; HÜHN u. Mit., 1973). Die genaue Funktion der a.Ph. in den Enterozyten ist bis zum heutigen Zeitpunkt weitgehend ungeklärt. Aufgrund der intrazellulären Lokalisation und der biochemischen Eigenschaften muß angenommen werden, daß die Aktivität der a.Ph. und die transmembranäre Transportleistung der Epithelzellen in einem funktionellen Verhältnis zueinander stehen.

1.5.2. Saure Phosphatase

Die saure Phosphatase (s.Ph.) besitzt ebenfalls wie die a.Ph. neben der hydrolytischen auch transphosphorylierende Eigenschaften. Die s.Ph. umfaßt eine heterogene Gruppe unspezifischer Phosphatasen, die ubiquitär im menschlichen und tierischen Organismus vorkommen, aber auch in Pflanzen z.B. in hoher Aktivität nachgewiesen werden können (HÖHN u. Mit., 1971). Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens gegenüber Aktivatoren und Inhibitoren können einzelne Fraktionen der s.Ph. differenziert werden.

Die s.Ph. gilt seit den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um de DUVE (1966) als lysosomales Leitenzym und neben zahlreichen weiteren sauren Hydrolasen als ein Träger der katalytischen Fraktion der Lysosomen. In der Darmschleimhaut kann die Hauptaktivität der s.Ph. in den Lysosomen der Epithelzellen nachgewiesen werden (HUGON u. BORGER, 1967 u. 1968).

Die spezielle Bedeutung der s.Ph. in den Epithelzellen der Darmschleimhaut im Ablauf der Resorptionsvorgänge kann noch nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

1.5.3. Laktat - Dehydrogenase

Die Laktat - Dehydrogenase (LDH) ist das wohl am häufigsten untersuchte Enzym der Glykolyse. Sie katalysiert die folgenden Reaktionen:



Die Aktivität der LDH soll in direktem Verhältnis zur Höhe der anaeroben Glykolyse stehen (KARLSON, 1970). Ebenso wird im Organis-

mus unter anaeroben Bedingungen Pyruvat zu Laktat reduziert. Diese Reaktionen laufen insbesondere in der quergestreiften Muskulatur ab, wenn bei mechanischer Arbeit die Sauerstoffzufuhr nicht ausreicht, um Pyruvat zu oxidieren.

Nachdem zuvor schon einige Autoren auf die molekulare Heterogenität der LDH hingewiesen hatten, konnten MARKERT u. MØLLER (1959) erstmals elektrophoretisch fünf Fraktionen der LDH auftrennen, die sie Isoenzyme nannten. APPELLA u. MARKERT (1961) differenzierten zwei Basismoleküle (Monomere), deren Synthese von zwei getrennten Genen kontrolliert werden soll. Jeweils vier dieser Basismoleküle bilden die funktionstüchtige LDH (Tetramere). Die beiden Monomere werden nach dem Ort ihrer Hauptlokalisation mit dem Buchstaben H (für Herzmuskulatur) und M (quergestreifte Muskulatur) gekennzeichnet. Aufgrund der Zusammenlagerung von jeweils vier der beiden verschiedenen Basismonomeren entstehen fünf Isoenzyme. In zahlreichen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Isoenzympmuster der LDH species- und organspezifisch sind (Zusammenfassung: KOWALEWSKI, 1972). Der H-Typ der LDH dominiert in Geweben mit überwiegend aerober Stoffwechsellaage, während der M-Typ bevorzugt in Organen mit anaerober Stoffwechsellaage vorkommt (KAPLAN u. Mit., 1963).

1.5.4. Malat - Dehydrogenase

die NAD^+ - abhängige Malat-Dehydrogenase (MDH) katalysiert im Zitronensäurezyklus die Umwandlung von L-Malat in Oxalacetat, während die NAD^+ - abhängige MDH für die Umwandlung von L-Malat in Pyruvat verantwortlich ist. Die NAD^+ - abhängige MDH ist sowohl im Zytoplasma als auch in Mitochondrien lokalisiert, wobei die intra- und extramitochondriale Aktivität der MDH in enger funktioneller Beziehung zueinander stehen (SILVERSTEIN u. SULEBELE, 1969). Elektrophoretisch werden zwei Isoenzyme der NAD^+ - abhängigen MDH aufgetrennt, wobei ein Isoenzym in der Mitochondrien-

fraktion und das andere im Überstand des Homogenates lokalisiert ist (Übersicht: CRISS, 1971).

2. Material und Methodik

2.1. Untersuchungsgut

Untersucht wurden 50 Dickdarmresektionspräparate⁺ mit der in Tabelle I aufgeführten Lokalisation und der aus Tabelle II zu entnehmenden histologischen Klassifizierung der in dieser experimentellen Studie berücksichtigten benignen und malignen epithelialen Tumoren (Abb. 1 - 6).

Sofort nach Entnahme der Darmpräparate wurden diese in einem mit Kohlesäureschnee gekühlten Thermosgefäß der weiteren Bearbeitung zugeführt. Die Resektionspräparate wurden zunächst mit kalter Ringerlösung gründlich gereinigt, Fixierung eines Tumoranteiles in 10%-ger Formalinlösung, anschließende Paraffineinbettung des Gewebes und Anfertigung histologischer Präparate zur lichtmikroskopischen Klassifizierung und Befundung der Tumoren. Für die histochemischen und disk-elektrophoretischen Untersuchungen ist die Entnahme von Gewebe aus dem Zentrum und Randbezirken der Tumoren sowie aus makroskopisch unauffälligen Schleimhautbezirken erforderlich. Die Polypen wurden - nach Entnahme von kleinen Gewebeproben - für die übliche lichtmikroskopische Untersuchung intoto der histochemischen und disk-elektrophoretischen Untersuchung zugeführt.

⁺Das Resektionsmaterial erhielten wir von der Chirurgischen Klinik der Universität Mainz (Dir.: Prof. Dr. F. Kümmerle). Herrn Prof. Dr. P. Kempf sei an dieser Stelle für die gute Zusammenarbeit gedankt.

	Coecum	Colon				Rectum
		asc.	transv.	desc.	sigm.	
Polypen	0	0	0	0	9	15
Karzinome	1	0	1	2	3	19

Tabelle 1: Lokalisation der untersuchten Darmtumoren

Polypen	Hyperplastische Polypen	adenomatöse Polypen	adenomatös-villöse Polypen	villöse Polypen
Anzahl	7	11	3	1

Karzinome	Adenokarzinome	Gallert-karzinome	solide Karzinome
Anzahl	19	2	6

Tabelle 2: Histologische Klassifizierung der untersuchten Darmtumoren



Abb. 1: Hyperplastischer Polyp der Dickdarmschleimhaut. Haematoxylin - Eosin. Vergr. 35x

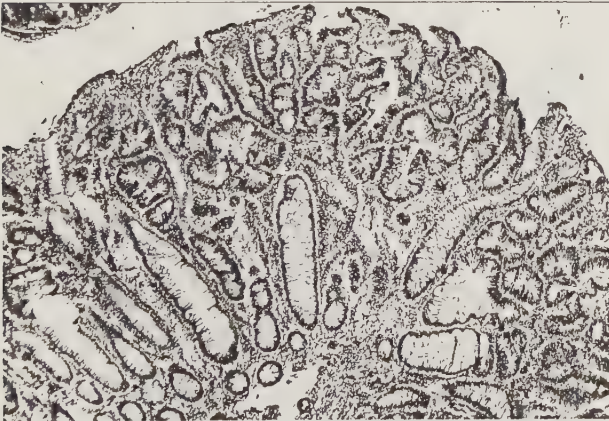


Abb. 2: Adenomatöser Polyp der Dickdarmschleimhaut. Haematoxylin - Eosin. Vergr. 90x

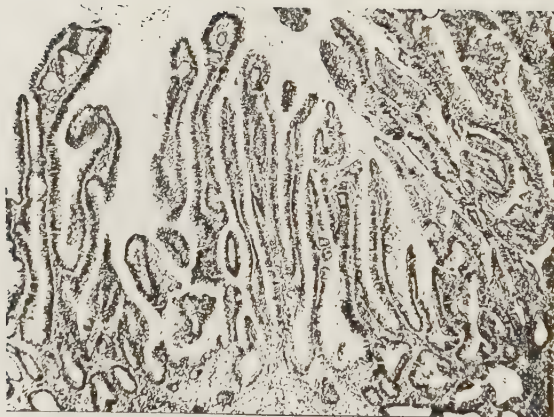


Abb. 3: Villöser Polyp der Dickdarmschleimhaut
Haematoxylin - Eosin. Vergr. 90x



Abb. 4: Adenocarcinom des Dickdarmes (aus einem
villösen Polypen hervorgegangen).
Haematoxylin - Eosin. Vergr. 90x



Abb. 5a: Hochdifferenziertes Adenocarcinom
des Dickdarmes. Haematoxylin - Eosin. Vergr. 90x

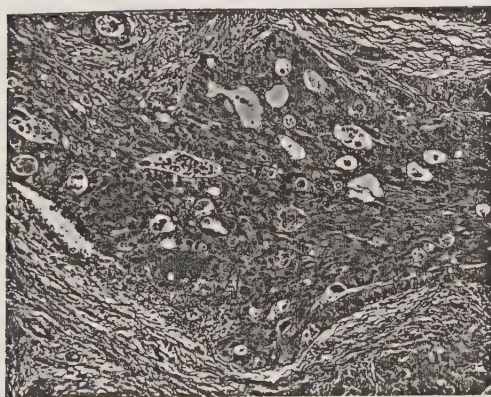


Abb. 5b: Wenig differenziertes Adenocarcinom
des Dickdarmes. Haematoxylin - Eosin. Vergr. 90x

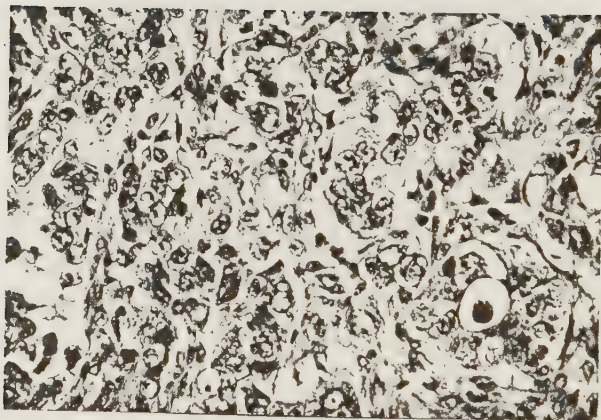


Abb. 6: Solides Carcinom des Dickdarmes.
Haematoxylin - Eosin. Vergr. 340x

2.2. Untersuchungsmethoden

2.2.1. Lichtmikroskopie

Zur Anfertigung der üblichen histologischen Präparate wurde das Gewebe in 10% - ige Formalinlösung gegeben und in Paraffin eingebettet. An den Schnittpräparaten wurden daraufhin folgende Färbungen durchgeführt: Hämatoxylin-Eosin und PAS.

2.2.2. Enzymhistochemie

Die histochemischen Untersuchungen wurden an frischen Kryostatschnitten (Schnittdicke: 8 μ) durchgeführt. Die Spezifitätskontrolle der Enzymreaktionen erfolgte durch Einbringung in Inkubationslösungen ohne Substrat. Die spezifischen Hemmreaktionen für die einzelnen Enzyme werden im Folgenden angegeben.

2.2.2.1. Alkalische Phosphatase

Fixation: Das Gewebe wurde in einer mit 0,0067 m Phosphatpuffer auf pH 7,2 eingestellten und 7,5% Saccharose enthaltende 4%-ige Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurde das Material 24 Stunden im Holt'schen Gemisch (HOLT, 1959) bei 4°C aufbewahrt.

Holt'sche Gemisch:	Saccharose	60,0 g
	Gummi arabicum	2,0 g
	Aqua dest.	ad 200,0 ml

Inkubationsmedium und Durchführung der Inkubation

(GÜSSNER, 1958 modifiziert nach MEIER - RUGE u. Mit., 1971)

Na - alpha - Naphtylphosphat	20 mg
Borax sicca	750 mg
Natriumhydrogencarbonat	500 mg
Echtblausalz BB	90 mg

Das Trockenmedium wird tiefgekühlt aufbewahrt (-20°C) und bei Bedarf in 40 ml Aqua dest. aufgelöst (pH 9,1 - 9,2), filtriert und in einem Vakuumgerät entgast.

Inkubationsdauer: 15 Min. bei 37°C

Nachbehandlung der Schnitte: Schnitte in Aqua dest. spülen und in Glycerin - Gelatine eindecken.

Kontrolluntersuchungen mit Hemmsubstanzen: Vorinkubation der Schnitte in 0,001 m KCN-, 0,1 m NaCN- und 0,01 m L-Cysteinlösung (pH 9,2); Simultaninkubation mit 0,01 m NaF-, 0,005 m und 0,05 m L - Phenylalanin.

2.2.2.2. Saure Phosphatase

Fixierung und Vorbehandlung des Gewebes wie bei der a.Ph.

Inkubationslösung und Durchführung der Inkubation

a. Bleisalzmethode nach GOMORI (1950)

Inkubationslösung:

Acetatpuffer 0,05 m pH 5,3 40 ml

Natrium- β -Glycerophosphat 3 %ig

(Endkonzentration: 0,01 m) 5 ml

Bleiacetat 66,2 mg/ 5 ml Aqua dest.

(Endkonzentration: 0,004 m) 5 ml

pH 5,3 50 ml

Inkubation: 15 - 90 Min. bei 37°C

Nachbehandlung der Schnitte:

Spülen in Aqua dest., 1 Minute in 2%-iger Essigsäure bei 22°C nachinkubieren. Spülen in Aqua dest.

Farbentwicklung in 1%-iger Ammoniumsulfid (1 - 2 Min.).

Spülen in Aqua dest. Entwässern der Schnitte in der Alkoholreihe. Eindecken mit Eukitt.

b. Methode nach BARKA und ANDERSON (1962)

Inkubationslösung:

Lösung A:	Veronal-Acetat(Michaelis)-Puffer	
	0,05 m pH 5,0	10,0 ml
	10 mg Naphtol-AS-BI-	
	Phosphat/1 ml Dimethylformamid	2,0 ml
Lösung B:	Pararosailin-HCL	1,6 ml
	4%-iges Natriumnitrit	
	(frisch anzusetzen)	1,6 ml

Lösung A und B mischen mit 1 n Natronlauge auf pH 5,0 einstellen.

Pararosailin-HCL: 1 g Pararosailin-HCL (Fuchsin P) in 20 ml Aqua dest. lösen und unter leichtem Erwärmen 5 ml konz. HCL hinzugeben. Nach Abkühlung der Lösung filtrieren und die Lösung bei Zimmertemperatur aufbewahren.

Inkubation: 60 Minuten bei 37° C

Nachbehandlung der Schnitte: Nach der Inkubation die Schnitte in Aqua dest. spülen und mit Glycerin-Gelatine eindecken.

c. Methode nach MEIER-RUGE (1971) modifiziert nach der Methode von BARKA und ANDERSON (1962)

Inkubationslösung:

Lösung A:	Natrium-alpha-Naphtylphosphat	80,0 mg
	0,9%-iges Natriumchlorid	32,0 mg
	Acetatpuffer 0,2 m pH 5,5	8,0 mg
(Diese Lösung kann bei -20° C mehrere Monate aufbewahrt werden.)		

Lösung B:	Pararosanilin-HCL	1,2 ml
	4%-iges Natriumnitrit	
	(frisch anzusetzen)	1,2 ml
	Polyvinylpyrrolidon (MG: 24000)	1,4 g

Lösung A und B mischen und mit 1 n Natronlauge auf pH 5,5 einstellen.

Inkubation: 30 Minuten bei 37° C

Nachbehandlung der Schnitte: Spülen in Aqua dest. 30 Min.

Nachinkubation in 1%-iger Sulfanil-Essigsäure (pH 2 - 3).

Danach in Aqua dest. spülen. Eindecken mit Glycerin - Gelatine.

Kontrolluntersuchungen mit Hemmsubstanzen:

Bei einigen Tumoren und unbehandelten Tieren wurden Kontrolluntersuchungen durchgeführt.

1. Inkubation der Schnitte in den oben angeführten Lösungen, jedoch ohne Substrat.
2. 30 min. vor Inkubation in 0,01 m L - Cysteinlösung bei pH 5,0 und 5,5; in 0,001 m KCN-Lösung und 0,1 m NaCN - Lösung ebenfalls bei pH 5,0 und 5,5 und 37° C.
3. Inkubationslösung mit 0,01 m NaF, 0,05 m L - Phenylalanin und 0,02 m L - Weinsäure.

2.2.2.3. Lactatdehydrogenase (PEARSE 1972)

Vorbehandlung der Schnitte: 8µ dicke Kryostatschnitte lufttrocknen lassen.

Inkubationslösung: Natrium-DL-Lactat 1,0 m (112 mg/ 1 ml)
4 ml

NAD ⁺	1,0 m (735 mg/1 ml)	4 ml
NaCN	0,1 m (mit 1 n HCL auf pH 7,2 eingestellt)	4 ml
MgCL ₂	0,05 m (507 mg/ 50 ml)	4 ml
Phosphatpuffer 1/15 m	pH 7,0	10 ml
0,1%-iges Nitro-Bluetetrazolium		10 ml
Aqua dest.		<u>4 ml</u>
	pH 7,2	40 ml

Zu der Inkubationslösung wurde 1,4 g Polyvinylpyrrolidon
(MG: ca. 24000) zugeben.

Nachbehandlung der Schnitte: 1 Minute lang in physiolo-
gischer Kochsalzlösung spülen. Dann die Schnitte in 10%-iger
Formaldehydlösung fixieren. Spülen in Aqua dest.
Eindecken der Schnitte mit Glycerin - Gelatine.

2.2.2.4. Malatdehydrogenase (PEARSE 1972)

Vorbehandlung 12 µ dicke Kryostatschnitte
der Schnitte: lufttrocknen

Inkubation: 60 Min. bei 37° C

Inkubationslösung: Lösung A:

Nitro-BT (4 mg/ml)	2,5 ml
0,2 m Tris-Puffer pH 7,4	2,5 ml
5 mM Magnesiumchlorid	1,0 ml
Aqua bidest.	<u>3,0 ml</u>
pH 7,4	9,0 ml

Lösung B:

1,0 m Na-L-Malat mit 40% NaOH
auf pH 7,4 einstellen.
Lösungen bei -20° C lagern.

Zur Inkubation werden die Lösungen A und B gemischt:

0,9 ml Lösung A und 0,1 ml Lösung B

Kurz vor Beginn der Inkubation pro ml
Inkubationslösung 2 mg NAD^+ zugeben.

Nachbehandlung Spülen in Aqua bidest. 15 Min. in 10%-igem
der Schnitte: Formalin fixieren. Spülen in Aqua bidest.
indecken mit Glycerin - Gelatine.

2.2.3. Disk - Elektrophorese

Es wurde die diskontinuierliche Polyacrylamid - Elektrophorese angewandt. (ORNSTEIN, 1964; DAVIS, 1964)

2.2.3.1. Aufarbeitung der Gewebeproben:

Abwiegen von 0,1 g Tumorgewebe und 0,1 g normale Darmschleimhaut.

Zugabe von jeweils 1,66 ml kalter Ringerlösung (4°C).

1 Min. Homogenisierung mit einem Teflon R - beschichteten

Messerhomogenisator (YANKE & KUNKEL KG, Staufen i. Br.;

Modell: Ultra-Turrax). Das Homogenisat wurde sofort in einem Kühlraum bei 4°C mit 4800 U/min. 10 Minuten zentrifugiert.

Von dem Zentrifugat werden 0,2 ml klarer Überstand abpipetiert und mit 3,8 ml 40%-iger Saccharoselösung vermischt. Jeweils 0,3 ml dieses Gemisches wird in die betriebsbereiten Elektrophoreseröhrchen eingegeben.

Neben menschlicher Dickdarmschleimhaut und Dickdarmtumoren werden in geringerem Umfang auch noch einige andere Gewebe elektrophoretisch untersucht: menschliche Plazenta, Plazenta von Ratten, normale Duodenalschleimhaut der Ratte und Tumoren des Rattenduodenum.

2.2.3.2. Durchführung der Elektrophorese und Anfärbung der Gele

2.2.3.2.1. Alkalische Phosphatase: modifiziert nach ALLEN und HYNICK, 1963

a. Herstellung des Sammelgels

Lösung A:	25,6 ml	1 m H_3PO_4			
	5,7 g	Tris ¹	ad	100 ml	H_2O
Lösung B:	13,2 g	Acrylamid			
	2,5 g	Bis ²	ad	100 ml	H_2O
Lösung C:	4,0 mg	Riboflavin	ad	100 ml	H_2O
Lösung D:	40,0 g	Saccharose	ad	100 ml	H_2O

Zur Herstellung eines 3,3%-igen Sammelgels von pH 6,9 wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:
 1 Teil Lösung A, 2 Teile Lösung B, 1 Teil Lösung C,
 4 Teile Lösung D.

b. Herstellung des Trenngels

Lösung A:	48,0 ml	1 n HCL			
	36,3 g	Tris	ad	100 ml	H_2O
	0,23 ml	Temed ³			
Lösung B:	30,0 g	Acrylamid	ad	100 ml	H_2O
	0,8 g	Bis			
Lösung C:	0,14 g	Per ⁴	ad	100 ml	H_2O

Zur Herstellung eines 7,5%-igen Gels von pH 8,9 wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:
 1 Teil Lösung A, 2 Teile Lösung B, 4 Teile Lösung C,
 1 Teil H_2O .

-
- ¹ Tris: Trishydroxymethylaminomethan
² Bis: N,N' - Methylenebisacrylamid
³ Temed: N,N,N', N' - Tetramethyläthylendiamin
⁴ Per: Ammoniumperoxodisulfat

c. Herstellung des Elektrodenpuffers

6,0 g	Tris	
28,8 g	Glycin	ad 1000 ml H ₂ O

Zum Gebrauch wird dieser Puffer von
pH 8,3 10-fach verdünnt.

d. Herstellung der Bromphenolblaulösung

10,0 mg	Bromphenolblau	ad 1000 ml H ₂ O
---------	----------------	-----------------------------

e. Anfärbung der Gele (nach PEARSE, 1968)

Na-1-naphthylphosphat	1 mg/ml Puffer
Variaminblausalz B	1 mg/ml Puffer
Tris-HCL-Puffer, pH 9,5	20 ml
	20 ml pH 9,5

Inkubationszeit: 90 Minuten bei 37° C

Nachbehandlung: 2- minütiges Spülen der Gele unter fließendem Wasser und Lagerung der Gele in 7%-iger Essigsäure.

2.2.3.2.2. Saure Phosphatase: modifiziert nach WILLIAMS und REISFELD (1964), KASCHNITZ (1967) und HÜHN (1971)

a. Herstellung des Sammelgels

Lösung A:	39 ml	1 m H ₃ PO ₄	
	4,95 g	Tris	
	0,46 ml	Temed, pH 5,5	ad 100 ml H ₂ O
Lösung B:	10,0 g	Acrylamid	
	2,5 g	Bis	ad 100 ml H ₂ O

Lösung C:	4,0 mg	Riboflavin	ad 100 ml	H ₂ O
Lösung D:	40,0 g	Saccharose	ad 100 ml	H ₂ O

Zur Herstellung eines 2,5%-igen Sammelgels von pH 5,5 wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

1 Teil Lösung A, 2 Teile Lösung B, 1 Teil Lösung C,
4 Teile Lösung D.

b. Herstellung des Trenngels

Lösung A:	48 ml	1 n HCL		
	6,85 g	Tris		
	0,46 ml	Temed	ad 100 ml	H ₂ O
			pH 7,5	

Lösung B:	30,0 g	Acrylamid		
	0,8 g	Bis	ad 100 ml	H ₂ O

Lösung C:	0,14 g	Per	ad 100 ml	H ₂ O
-----------	--------	-----	-----------	------------------

Zur Herstellung eines 7,5%-igen Trenngels von pH 7,5 wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

1 Teil Lösung A, 2 Teile Lösung B, 4 Teile Lösung C,
1 Teil H₂O.

c. Herstellung des Elektrodenpuffers

5,52 g	Diäthylbarbitursäure			
1,0 g	Tris	ad 100 ml	H ₂ O	
		pH 7,0		

d. Herstellung der Methylenblaulösung

5 mg	Methylenblau	ad 100 ml	H ₂ O
------	--------------	-----------	------------------

e. Anfärbung der Gele (ANDERSON u. Mit., 1962)

Veronalpuffer	0,05 m	24 ml
---------------	--------	-------

Na-1-naphtylphosphat	0,1% (0,001 g/ml)	0,024 g
Fast Garnet GBC	0,2% (0,002 g/ml)	0,048 g
	pH 4,9	

Inkubationszeit: 120 Minuten bei 4° C

Nachbehandlung: 2-minütiges Spülen der Gele unter fließendem Wasser und Lagerung in 7%-iger Essigsäure.

2.2.3.2.3. Lactatdehydrogenase: modifiziert nach DIETZ und LUBRANO (1967 und 1970)

a. Herstellung des Trenngels

Lösung A:	48 ml	1 n HCL	
	36,6 g	Tris	ad 100 ml H ₂ O
	0,23 ml	Temed	pH 8,9
Lösung B:	30,0 g	Acrylamid	
	0,8 g	Bis	ad 100 ml H ₂ O
Lösung C:	0,14 g	Per	ad 100 ml H ₂ O

Zur Herstellung eines 7,5%-igen Gels von pH 8,9 wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

1 Teil Lösung A, 2 Teile Lösung B, 4 Teile Lösung C,
1 Teil H₂O.

b. Herstellung des Elektrodenpuffers

6,0 g	Tris	
28,8 g	Glycin	ad 100 ml H ₂ O
		pH 8,3

Zum Gebrauch wird der Puffer von pH 8,3 im Verhältnis
1 : 10 verdünnt.

c. Herstellung der Bromphenolblaulösung

10,0 mg Bromphenolblau ad 1000 ml H₂O

d. Anfärbung der Gele (Nachlas u. Mit., 1958)

NAD ⁺	5 mg/ml H ₂ O	1,5 ml
Nitro BT	5 mg/ml H ₂ O	1,5 ml
Phosphatpuffer	pH 7,4	5,0 ml
Natriumlactat	0,5 m	3,0 ml
Aqua bidest.		4,0 ml

Phenazinmethosulfat 1 mg/ml H₂O
0,25 ml/ 10 ml
Inkubationslösung

Inkubationszeit: 30 Minuten bei Zimmertemperatur

Nachbehandlung: 2-minütiges Spülen der Gele unter fließendem Wasser und Lagerung in 7%-iger Essigsäure.

2.2.3.2.4. Malatdehydrogenase: modifiziert nach DIETZ und LUBRANO (1967)

a. Herstellung des Trenngels

Lösung A:	48,0 ml	1 n HCL	ad 100 ml H ₂ O
	36,3 g	Tris	
	0,23 ml	Temed	
Lösung B:	30,0 g	Acrylamid	
	0,8 g	Bis	
Lösung C:	0,14 g	Per	ad 100 ml H ₂ O

Zur Herstellung eines 7,5%-igen Gels von pH 8,9 wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

1 Teil Lösung A, 2 Teile Lösung B, 4 Teile Lösung C,
 1 Teil H₂O.

b. Herstellung des Elektrodenpuffers

6,0	g	Tris	
28,8	g	Glycin	ad 1000 ml H ₂ O

Zum Gebrauch wird dieser Puffer von pH 8,3 10-fach verdünnt.

c. Herstellung der Bromphenolblaulösung

10,0	mg	Bromphenolblau	ad 1000 ml H ₂ O
------	----	----------------	-----------------------------

d. Anfärbung der Gele (PEARSE, 1960)

Stammlösung

Nitro-blau Tetrazolium	1 mg/ ml	H ₂ O	5 ml
Tris Puffer	pH 7,4		5 ml
Na-Cyanid	0,1 m		2 ml
H ₂ O			6 ml
	pH 7,4		18 ml

Substratlösung

Na-Malat	0,31 g	ad 2 ml	
Stammlösung			18 ml
Substratlösung			2 ml
			20 ml

Pro 10 ml Inkubationslösung werden 20 mg NAD⁺ hinzugefügt, sowie 0,25 ml Phenazinmethosulfat (1 mg/ml H₂O).

Inkubationszeit:	30 Minuten bei Zimmertemperatur
Nachbehandlung:	2-minütiges Spülen der Gele unter fließendem Wasser und Lagerung in 7%-iger Essigsäure.

2.2.3.3. Kontrolluntersuchungen mit Hemmsubstanzen

Analog zu den histochemischen Untersuchungen werden auch an den Elektrophoresegelen von Tumorhomogenaten und Homogenaten normaler Gewebeproben Spezifitätskontrollen und Untersuchungen mit Hemmsubstanzen durchgeführt.

Alkalische Phosphatase

Hemmung in Inkubationslösungen mit 0,01 m und 0,05 m L - Phenylalanin und 0,05 m L - Homoargininlösung; sowie 5 Minuten dauernde Erwärmung des Homogenates auf 65° C (sogenannte Hitzeinaktivierung).

Saure Phosphatase

Inkubationslösung mit 0,01 m Natriumfluorid, 0,05 m L - Phenylalanin und 0,02 m L - Weinsäure. Sogenannte Hitzeinaktivierung wie oben bei der alkalischen Phosphatase beschrieben.

2.2.4. Durchführung der Elektrophorese

Die elektrophoretischen Untersuchungen wurden mit dem Gerät der Firma Canalco Inc. durchgeführt. Ebenso wurden alle für die Herstellung der Polyacrylamid - Gele notwendigen Chemikalien sowie sonstiges Zubehör für die Disk-Elektrophorese von der Herstellerfirma bezogen. Durchführung der Disk-Elektrophorese nach RAYMOND u. WEINTRAUB (1959), RAYMOND, ORNSTEIN u. DAVIS (1964) und MAURER (1968).

- a. Die in 10%-iger Dichromat-Schwefelsäure gereinigten Gelröhrchen werden zunächst mit Aqua dest. und danach mit

Ionenaustauscher-Wasser gespült, anschließend für etwa 5 - 10 Minuten in eine 1%-ige wässrige Lösung von Kodak-Photo-Flo (Lösung eines nicht ionogenen Tensids) getaucht und darauf in einem Trockenschrank aufrecht stehend getrocknet.

- b. Die Gelröhrchen werden in den Gelzubereitungsständer eingesetzt und dabei an der unteren Öffnung durch Parafilm verschlossen.
- c. Die nach der oben beschriebenen Anleitung frisch angesetzten Trenngellösungen werden bis zu einer von der Unterseite gemessenen Markierung (entspricht etwa 1,5 ml) in die Röhrchen jeweils mit einer 10 ml-Spritze durch einen aufgesetzten Polyäthylenschlauch luftblasenfrei eingefüllt.
- d. Die Trenngellösungen werden vorsichtig mit etwa 0,1 ml Aqua dest. überschichtet. Dabei ist besonders zu beachten, daß die Grenzen zwischen den Schichten scharf sind und auf keinen Fall Vermischung der Schichten auftreten darf. Dieser Arbeitsgang ist notwendig, um eine Meniskusbildung der Gele zu vermeiden. Man benutzt hierfür eine Tuberkulinspritze mit aufgesetzter stumpfer Spezialnadel.
- e. Es folgt eine 30 min. (LDH und MDH bzw. 60 min. alkalische und saure Phosphatase) Polymerisation unter einer UV-Lampe.
- f. Nach der Polymerisation wird das überschichtete Wasser mit Filterpapierstreifen, ohne das Gel zu berühren, vorsichtig abgesaugt. Im Falle der Lactat- und Malat-Dehydrogenase erfolgt nun die blasenfreie Auffüllung von 0,3 ml

- Substanzlösung (Zentrifugatüberstand-Saccharose-Gemisch). Die Substanzlösung wird mit gekühltem Elektrodenpuffer überschichtet.
- g. Für die Elektrophorese der alkalischen und sauren Phosphatase erfolgt nun die Zubereitung der Sammelgellösung. Mit einer Enzympipette wird 0,2 ml der Sammelgellösung in jedes Gelröhrchen luftblasenfrei eingefüllt und wieder in oben beschriebener Weise mit Aqua dest. überschichtet. Polymerisationsdauer: 60 Min. (s.Ph.) und 45 Min. (a.Ph.) Anschließend wird kalter Elektrodenpuffer luftblasenfrei über dem Sammelgel bis zum oberen Rand des Gelröhrchens eingefüllt. Nun wird mit einer Enzympipette der in das Elektrophoreseröhrchen eingefüllte Puffer mit jeweils 0,3 ml Substanzlösung unterschichtet. Alle beschriebenen Arbeitsgänge zum Einfüllen der Substanzlösungen müssen mit gekühlten Pipetten durchgeführt werden.
- h. Einsetzen der so präparierten Gelröhrchen in den oberen Elektrophoresetopf.
- i. Nach Einfüllen von 300 ml des jeweiligen Elektrodenpuffers in den oberen Puffertopf, werden nun bei Auftrennung der a.Ph., der LDH und MDH 1 ml Bromphenolblaulösung, und bei der s.Ph. 1 ml Methylenblaulösung zugesetzt, um die am schnellsten wandernden Enzymfraktionen zu markieren. Die restlichen 700 ml des Elektrodenpuffers werden in den unteren Puffertopf eingefüllt und eine Gleichspannung von 300 Volt bei 2,5 mA pro Röhrchen angelegt. Die elektrophoretische Auftrennung wird wegen der sich entwickelnden Wärme im Kühlschrank bei 4° C vollzogen.
- j. Dauer der Auftrennung bei der a.Ph. 105 Min., bei der s.Ph. 120 Min., bei der LDH und MDH 90 Min.

- k. Am Ende der Elektrophorese, nach Entnahme der Gelröhrchen aus dem Elektrophoresetopf, werden durch eine Spritze mit aufgesetzter, abgestumpfter Spezialnadel die Gele aus den Röhrchen entfernt.
- l. Die Gele werden in Inkubationsröhrchen eingesetzt und sofort inkubiert.
- m. Beendigung der Inkubation durch Spülen der Gele mit Aqua dest. Lagerung der Gele in 7,0%-iger Essigsäure in geschlossenen Gelaufbewahrungsröhrchen. Bei Lagerung der Gele im Kühlschrank blieben die Banden einwandfrei getrennt.
- n. Die Auswertung der Gele erfolgte auf einem Densitometer mit angeschlossenem Integralschreiber (Canalgo Inc.; Modell K).

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der histochemischen Untersuchungen

3.1.1. Alkalische Phosphatase: Die Kryptenepithelzellen der normalen Dickdarmschleimhaut lassen keine spezifische histochemische Reaktion erkennen. Demgegenüber kann im Bürstensaum, der an der Mukosaoberfläche gelegenen Zylinderepithelien, eine schwache Aktivität der a.Ph. nachgewiesen werden. Die Becherzellen- sowohl in den Krypten als auch an der Oberfläche der Schleimhaut - zeigen histochemisch keine wesentliche Aktivität der a.Ph. In allen Abschnitten und Wand-schichten des Dickdarmes läßt sich die a.Ph. in den Kapillaren nachweisen (Abb. 7 - 9).

Die hyperplastischen Polypen zeigen eine gleiche histochemische Reaktion der a.Ph. wie die normale Dickdarmschleimhaut (Abb. 10).

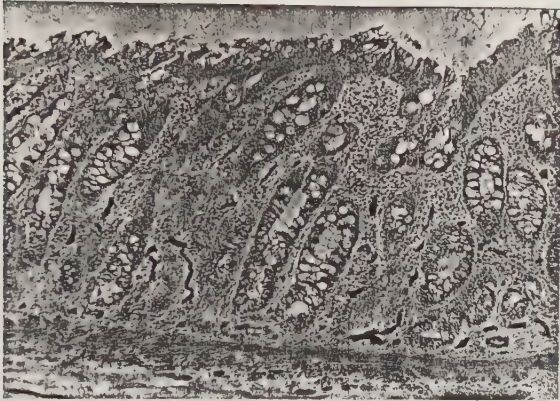


Abb. 7: Histochemische Darstellung der alkalischen Phosphatase in der normalen Dickdarmschleimhaut.
Vergr. 90x

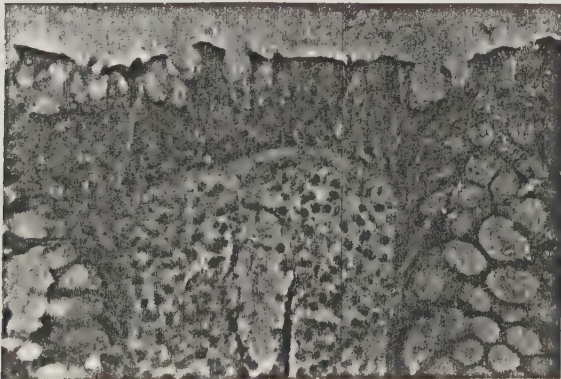


Abb. 8: Positive Reaktion der alkalischen Phosphatase in den Zylinderepithelien und der Schleimhaut-
oberfläche. Vergr. 560x

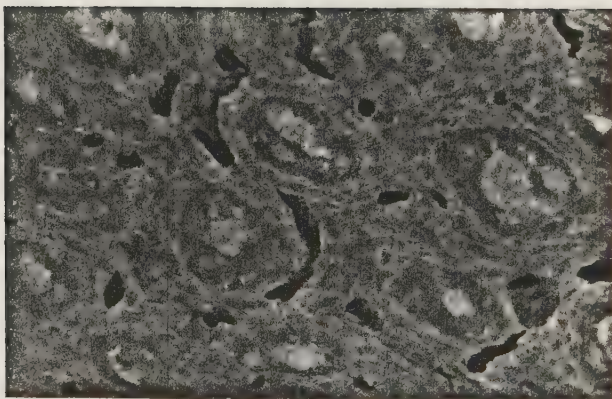


Abb. 9: Positive Reaktion der alkalischen Phosphatase
in den Kapillaren der Dickdarmschleimhaut.
Vergr. 560x

Abb. 10a

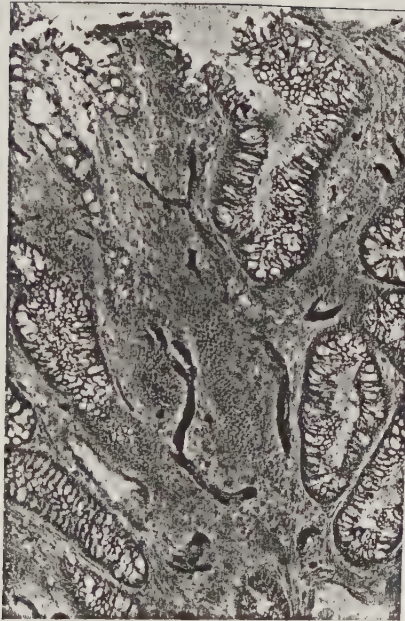


Abb. 10b



Abb. 10a+b: Histochemische Darstellung der alkalischen Phosphatase in einem hyperplastischen Polypen der Dickdarmschleimhaut.
Vergr. 340x

In Adenomen und Adenocarcinomen färbt sich nur noch bei einzelnen wenigen Tumorzellen die apikale Zellmembran beim histochemischen Nachweis der a.Ph. an. Die Kapillaren zwischen den Drüsenschläuchen reagieren häufig positiv.

Die a.Ph. zeigt innerhalb der soliden Carcinome eine sehr unterschiedliche Aktivität, wobei sich Tumorzellen und Tumorstroma in wechselndem Ausmaß anfärben. In einigen Carcinomen läßt sich die a.Ph. histochemisch in der äußeren Zellmembran der Tumorzellen nachweisen (Abb. 11). Daneben finden sich manchmal in den Tumorzellen große, runde intrazytoplasmatische Areale mit spezifischen Farbstoffpräzipitaten. Möglicherweise handelt es sich bei derartig positiv reagierenden Zellen um Tumorzellen mit intrazytoplasmatischen Lumenbildungen mit einer positiven Reaktion im Bereich der Mikrovilli-besetzten Membranen, die diese intrazytoplasmatische Lumina umgibt (vgl. HÖHN, 1977).

Kontrollreaktionen: L - Cystein hemmt die Aktivität der a.Ph. in allen Strukturen vollständig. L - Phenylalanin (0,05 m) hemmt bei der Methode von GOESSNER und BURSTONE die Aktivität der a.Ph. in allen Strukturen; bei Anwendung der Gomori - Methode zeigt sich eine deutliche Aktivitätsminderung der äußeren Zellmembran der Epithelzellen bei weitgehend erhaltener Aktivität im Zottenstroma. L - Phenylalanin (0,005 m) schwächt bei Anwendung der Methode von GOESSNER und GOMORI die Aktivität im Bürstensaum ab, die Stromareaktion bleibt weitgehend erhalten. KCN und NaCN hemmen die Aktivität der Phosphatase in der äußeren Zellmembran geringfügig, während die Reaktion in den übrigen Strukturen negativ wird. NaF hat keinen Einfluß auf die Aktivität der a.Ph.

3.1.2. Saure Phosphatase: In histochemischen Präparaten von der normalen Dickdarmmukosa ist die s.Ph.-Aktivität der Krypten- und Oberflächen-Epithelien überwiegend in supra- und para-

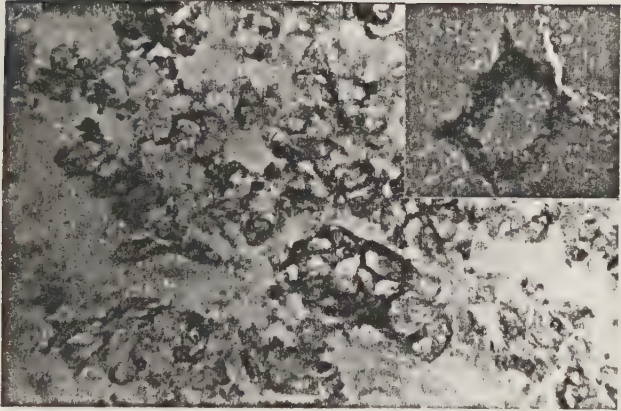


Abb. 11: Positive Reaktion der alkalischen Phosphatase
in der äußeren Zellmembran von Tumorzellen in einem so-
liden Carcinom des Dickdarmes. Vergr. 340x.
(Inset: 1400x)

nukleären Granula lokalisiert, bei denen es sich nach den histochemischen Befunden um Lysosomen handelt (vgl. HÖHN, 1977). Die oberflächlich gelegenen Zylinderepithelien besitzen die höchste s.Ph.-Aktivität, während die Vorstufen der Zylinderepithelien in den Krypten und die Becherzellen geringere Aktivitäten erkennen lassen. Einzelne Makrophagen der Lamina propria reagieren ebenfalls positiv beim histochemischen Nachweis der s.Ph.

Die hyperplastischen Polypen zeigen eine gleiche histochemische Reaktion der s.Ph. wie die normale Dickdarmschleimhaut.

Die Aktivität der s.Ph. ist in den Tumorzellen der Adenome und Carcinome etwa gleich stark bzw. in einzelnen Tumoren auch geringer als in den Kryptenepithelien der normalen Dickdarmschleimhaut. Im supranukleären Zytoplasma der Mehrzahl der Tumorzellen findet sich eine feingranuläre Reaktion, während in einzelnen Tumorzellen gröbere Farbstoffpräzipitate zu beobachten sind. Die Makrophagen zwischen den Drüsenschläuchen zeigen ebenfalls eine positive s.Ph.- Reaktion.

Kontrollreaktion: Mit NaF erfolgt eine vollständige und mit L - Weinsäure eine nahezu vollständige Hemmung der s.Ph. Mit KCN und NaCN wird die Reaktion der s.Ph. in den Epithelien der normalen Mukosa und den Tumorzellen negativ, während die Reaktionen in den Zellen des Stromas abgeschwächt werden. L - Cystein und L - Phenylalanin haben keinen Einfluß auf die s.Ph.

3.1.3. Laktat- und Malat - Dehydrogenase: Die LDH und MDH zeigen in der normalen Dickdarmschleimhaut eine weitgehend identische Lokalisation der unter dem Enzymeinfluß gebildeten Formazan-Granula. Die Aktivität der LDH und MDH ist im Zylinderepithel an der Mukosaoberfläche höher als in den Kryptenepithelien und in den Becherzellen. In den Zylinderepithelien findet sich die höchste Aktivität im apikalen

Zytoplasmabereich; hier konfluieren die Formazan-Granula. Geringere Enzymaktivitäten lassen sich perinukleär im Zytoplasma nachweisen.

Die hyperplastischen Polypen zeigen eine gleiche histochemische Reaktion der LDH und MDH wie die normale Dickdarmschleimhaut.

Die Aktivität der LDH und MDH fällt in den Tumorzellen der Adenome (Abb. 12 a + b) und Adenocarcinome (Abb. 13) gegenüber den Zylinderepithelien der normalen Schleimhaut zumeist deutlich ab. In den Tumorzellen nimmt vor allem die Aktivität im apikalen Zytoplasma ab, während sie perinukleär und infranukleär weitgehend stabil bleibt bzw. nur geringgradig abnimmt. In schleimbildenden Tumorzellen werden die Formazan-Granula durch die intrazytoplasmatische Schleimansammlung in die Zellperipherie verdrängt. Insgesamt ist die Aktivität der LDH und MDH in diesen Tumorzellen niedriger als in Tumorzellen ohne Schleimbildung (Abb. 14).

Eine etwa gleichbleibende Aktivität der LDH und MDH wie in den Tumorzellen drüsenbildender Tumoren zeigen auch die Tumorzellen solider Carcinome (Abb. 15).

Spezifitätskontrolle: Nach Erwärmen der Schnitte im Wasserbad auf 80 - 90° C und bei Inkubation ohne Substrat erfolgt keine wesentliche Enzymreaktion mehr.

3.2. Ergebnisse der disk - elektrophoretischen Untersuchungen

3.2.1. Alkalische Phosphatase: In der normalen Dickdarmmukosa lassen sich drei Fraktionen der a.Ph. auftrennen (Abb. 16 a). Diese drei Enzymfraktionen zeigen eine nahezu gleich hohe Enzymaktivität. Gleichartige Pherogramme wie bei der normalen Dickdarmmukosa ergeben sich auch bei der Auftrennung der a.Ph. in hyperplastischen Polypen (Abb. 16 b). In Homogenaten von Adenomen (Abb. 16 c), Adenocarcinomen (Abb. 16 d) und soliden Carcinomen (Abb. 16 e) können ebenfalls drei Fraktionen

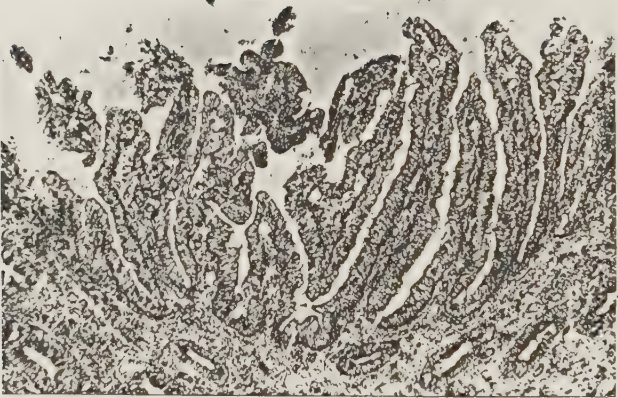


Abb. 12a: Histochemische Reaktion der LDH in einem villösen Polypen. Vergr. 90x

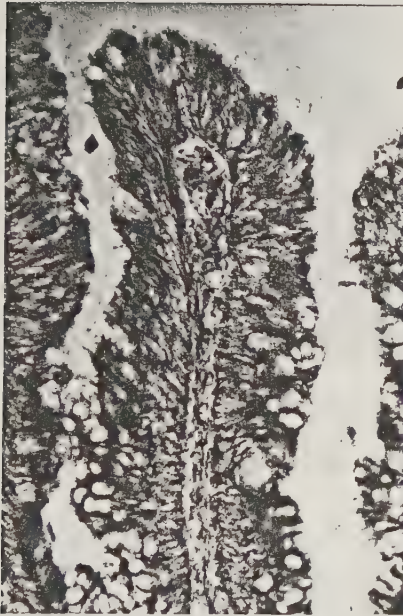


Abb. 12b: Histochemische Reaktion
in einem villösen Polypen.
Vergr. 340x

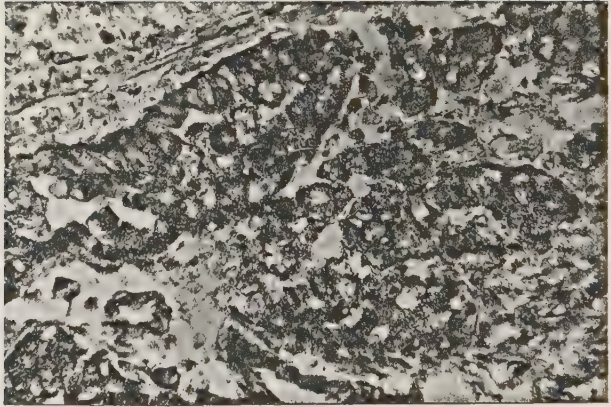


Abb. 13: Histochemische Reaktion der LDH in einem Adenocarcinom des Dickdarmes. Vergr. 340x

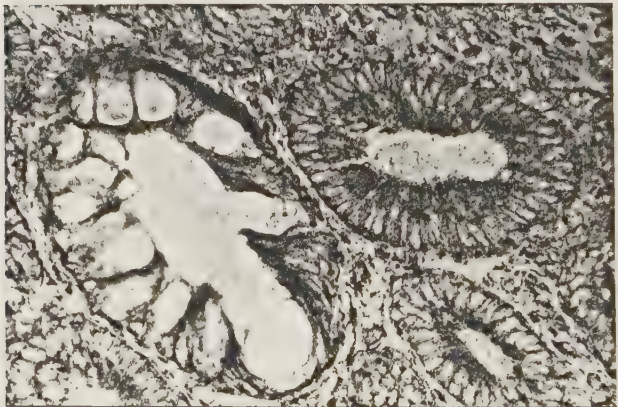


Abb. 14: Histochemische Reaktion der LDH in einem Adenocarcinom des Dickdarmes (Drüsen mit Schleimbildung und Drüsen ohne Schleimbildung). Vergr. 340x

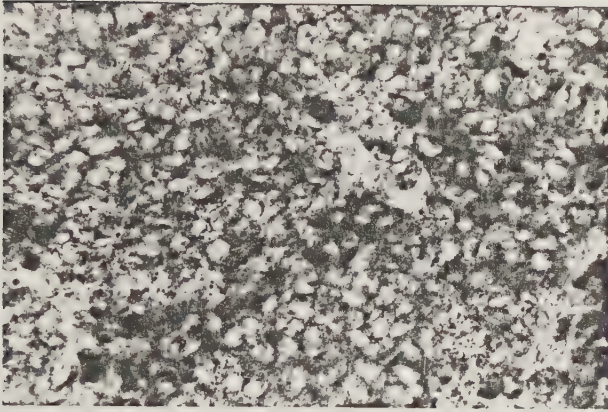


Abb. 15: Histochemische Reaktion der LDH in einem soliden Carcinom des Dickdarmes. Vergr. 340x



Abb. 16a-e: Disk-Elektropherogramm der alkalischen Phosphatase in der normalen Dickdarmschleimhaut (a), in einem hyperplastischen Polypen (b), in einem adenomatösen Polypen (c), in einem Adenocarcinom (d) und in einem soliden Carcinom (e) des Dickdarmes.

elektrophoretisch nachgewiesen werden, jedoch häufig mit deutlicher Aktivitätsdominanz der mittleren Enzymfraktion.

Disk - elektrophoretische Auftrennung der alkalischen Placentaphosphatase: In Placentahomogenaten können disk - elektrophoretisch zwei Fraktionen mit hoher Aktivität und jeweils eine langsam und eine schnell wandernde Fraktion mit geringer Aktivität aufgetrennt werden (Abb. 17 a).

Kontrolluntersuchungen mit Hemmsubstanzen: In Homogenaten der normalen Dickdarmschleimhaut wird mit 0,05 m L - Phenylalanin die Aktivität der a.Ph. vollständig gehemmt und mit 0,01 m L - Phenylalanin deutlich abgeschwächt. Nach Erwärmen der Gele auf 65° C erfolgt eine vollständige Inaktivierung der a.Ph.; 0,05 m L - Homoarginin hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Aktivität der a.Ph.

In mehreren Carcinomen (hauptsächlich in soliden Carcinomen mit positiver histochemischer Reaktion der a.Ph.) färbt sich etwa 0,5 bis 1 cm im Trenngel eine stark reagierende Fraktion der a.Ph. an (Abb. 18 a). Diese Fraktion zeigt gegenüber 0,05 m (Abb. 18 b) und 0,01 m (Abb. 18 c) L - Phenylalanin ein gleichartiges Verhalten wie die a.Ph. der normalen Mukosa. L - Homoarginin (Abb. 18 d) hingegen hemmt die Aktivität der a.Ph. in diesen Carcinomen nahezu vollständig, während beim Erwärmen der Gele auf 65° C (Abb. 18 e) die Aktivität mäßiggradig abgeschwächt wird.

Die Placentaphosphatase wird durch L - Phenylalanin nahezu vollständig gehemmt (Abb. 17 b + c), während L - Homoarginin (Abb. 17 d) und das Erwärmen der Gele auf 65° C (Abb. 17 e) zu keiner wesentlichen Aktivitätsminderung führen.

3.2.2. Saure Phosphatase: Die Aktivität der s.Ph. in den Elektropherogrammen der normalen Dickdarmschleimhaut ist nur sehr gering (Abb. 19 a). Nach Anfärbung der Gele stellt sich zumeist nur eine schwache Enzymfraktion dar, die etwa 1 - 2 cm

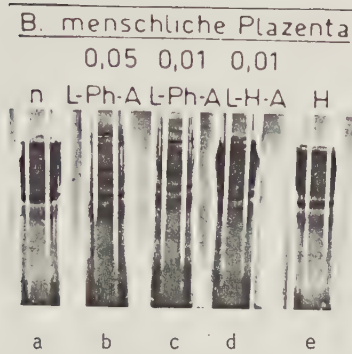


Abb. 17a-e: Disk-Elektropherogramm der alkalischen Placentaphosphatase ohne Hemmung(a), nach Einwirkung von 0,05 m L-Phenylalanin (b), 0,01 m L-Phenylalanin (c), 0,05 m L-Homoarginin (d) und nach Erwärmen auf 65° C (e).

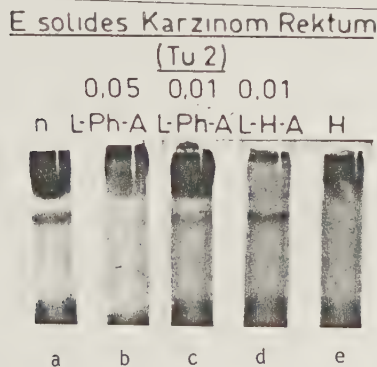


Abb. 18a-e: Disk-Elektropherogramm der alkalischen Phosphatase in einem soliden Carcinom des Dickdarmes ohne Hemmung (a), nach Einwirkung von 0,05 m L-Phenylalanin (b), 0,01 m L-Phenylalanin (c), 0,05 m L-Homoarginin (d) und nach Erwärmen auf 65° C (e).

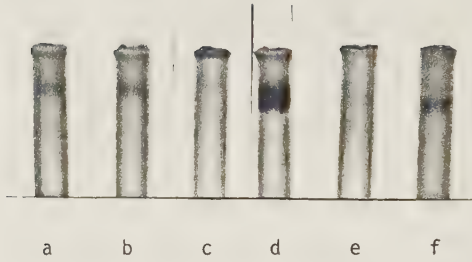


Abb. 19a-f: Disk-Elektropherogramm der sauren Phosphatase in der normalen Dickdarmschleimhaut (a), in einem hyperplastischen Polypen (b), in einem adenomatösen Polypen (c), in zwei Adenocarcinomen (d+e) und in einem soliden Carcinom (f) des Dickdarmes.

in das Trenngel hineinwandert. In den Homogenaten von hyperplastischen Polypen (Abb. 19 b) bietet sich ein Elektrophogramm wie bei der normalen Dickdarmschleimhaut. In den Adenomen (Abb. 19 c) und Carcinomen ist die elektrophoretisch nachweisbare Aktivität der s.Ph. von Tumor zu Tumor wechselnd stark ausgeprägt (Abb. 19 d - f). Während in einzelnen Tumoren keine Aktivität der s.Ph. mehr nachweisbar ist, stellt sich bei anderen Tumoren eine kräftige Enzymfraktion dar, die hinsichtlich ihrer Lokalisation der Enzymfraktionen der normalen Schleimhaut entspricht.

Kontrolluntersuchungen mit Hemmsubstanzen: NaF hemmt die s.Ph. in den Elektrophoresegelelen vollständig. NaCN, KCN und L- Weinsäure führen zu einer nahezu vollständigen Hemmung der s.Ph. L- Cystein und L- Phenylalanin bewirken nur eine geringgradige Hemmung der Aktivität der s.Ph.

3.2.3. Laktat - Dehydrogenase: In den Homogenaten der normalen Dickdarmschleimhaut können fünf Isoenzyme der LDH aufgetrennt werden mit einer Aktivitätsdominanz von LDH₄ und LDH₃ sowie einer in allen Elektrophogrammen nachweisbaren Aktivität von LDH₁, LDH₂ und LDH₅ (Abb. 20). Ein gleichartiges elektrophoretisches Bild wie in der normalen Dickdarmmukosa zeigt auch die LDH in den Homogenaten hyperplastischer Polypen (Abb. 21). In den Adenomen (Abb. 22) und in zunehmendem Maß in den Adenocarcinomen (Abb. 23) und soliden Carcinomen (Abb. 24) nimmt die Aktivität von LDH₁ und LDH₂ ab, während die Aktivität von LDH₅ zunimmt.

3.2.4. Malat - Dehydrogenase: Ebenso wie in der normalen Dickdarmschleimhaut kann die MDH auch in den Tumorumogenaten, sowohl bei den Polypen als auch bei den Carcinomen, in zwei Isoenzyme aufgetrennt werden (Abb. 25). Die Aktivität dieser beiden Enzyme variiert von Tumor zu Tumor, unabhängig

Abb. 20a

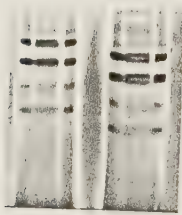


Abb. 20b

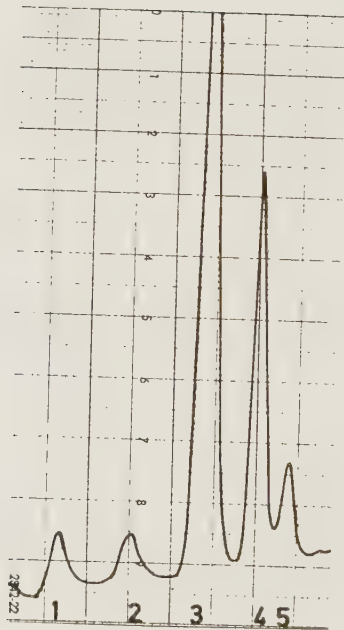


Abb. 20a+b: Disk-Elektropherogramm (a) und Densitogramm (b) der LDH-Isoenzyme in der normalen Dickdarmschleimhaut.

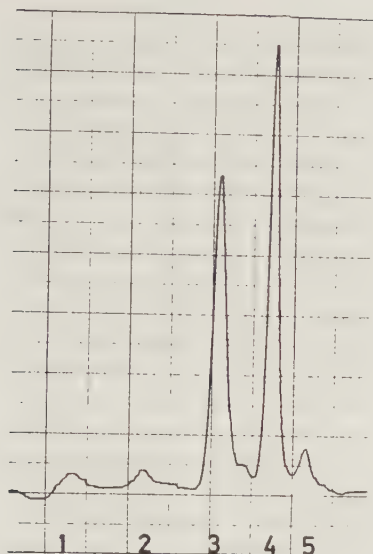


Abb. 21: Isoenzyme der LDH in einem hyperplastischen Polypen des Dickdarmes.

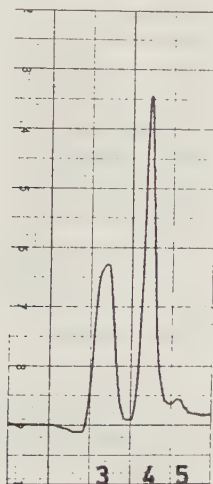


Abb. 22: Isoenzyme der LDH in einem adenomatösen Polypen des Dickdarmes.

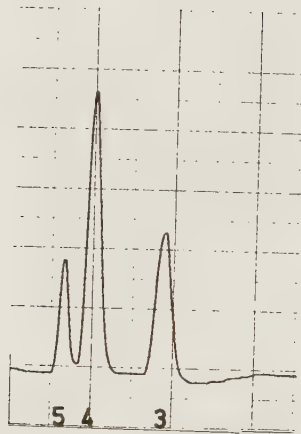


Abb. 23: Isoenzyme der LDH in einem Adenocarcinom des Dickdarmes.

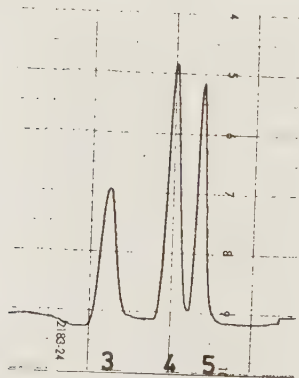


Abb. 24: Isoenzyme der LDH in einem soliden Carcinom des Dickdarmes.



Abb. 25: Elektropherogramm der MDH
in der normalen Dickdarmschleimhaut.

von der Differenzierung der Tumoren. Insgesamt läßt die MDH nach ihrer disk - elektrophoretischen Auftrennung keine tumorspezifischen Veränderungen erkennen.

4. Diskussion

Die histochemische Untersuchung der a.Ph. hat ergeben, daß in den an der Oberfläche gelegenen Zylinderepithelien der Dickdarmschleimhaut eine schwache Aktivität dieses Enzyms nachweisbar ist, während die Kryptenepithelien keine positive Reaktion zeigen. Disk - elektrophoretisch können in der normalen Dickdarmschleimhaut drei Enzymfraktionen mit geringer Aktivität aufgetrennt werden. Die hyperplastischen Polypen zeigen sowohl histochemisch als auch elektrophoretisch ein gleichartiges Verhalten wie die normale Dickdarmschleimhaut.

Während mit enzymhistochemischen Methoden in der äußeren Zellmembran normaler Kryptenepithelien keine Aktivität der a.Ph. nachweisbar ist, färbt sich - wie insbesondere elektronenmikroskopisch-histochemische Untersuchungen zeigen (vgl. HÜHN, 1977) - die apikale und laterale Zellmembran einzelner Tumorzellen der drüsenbildenden Tumoren positiv an. Eine besonders kräftige Reaktion findet sich in den Tumorzellen anaplastischer Carcinome, die ebenso wie bei den drüsenbildenden Carcinomen mit L- Phenylalanin hemmbar ist; im Gegensatz zu der a.Ph. der normalen Dickdarmmukosa bleibt jedoch nach Erwärmen der Gele auf 65° C häufig noch eine Restaktivität bestehen. Entsprechende Untersuchungen anderer Autoren an der menschlichen Colonschleimhaut und bei Colontumoren erbrachten widersprüchliche Ergebnisse. Die Mehrzahl dieser Autoren konnte, bei den ausschließlich lichtmikroskopisch-histochemisch durchgeführten Untersuchungen, in den Tu-

morzellen keine Aktivität der a.Ph. nachweisen (CZERNOBILSKY u. TSOU, 1968; KOUDSTAAL u. Mit., 1975), während nach MAGGI u. WYATT (1970) in den Tumorzellen der Colonicarcinome eine intensive histochemische Reaktion erfolgt.

Ein gleichartiges Phänomen beobachtete auch KARASAKI (1975) im Verlauf der experimentellen Kanzerisierung der Rattenleber: Während der malignen Transformation der Hepatozyten läßt sich in deren äußerer Zellmembran eine a.Ph. nachweisen, die sich aufgrund ihrer Lokalisation und ihres Verhaltens gegenüber Inhibitoren (Hemmung durch L- Phenylalanin, keine Hemmung durch L- Homoarginin und durch Erwärmung auf 65° C) von der normalen a.Ph. der Hepatozyten unterscheidet. Damit besitzt die a.Ph. in der Zellmembran der Hepatomzellen einige biochemische Eigenschaften, die in Carcinomen und auch im Serum von Krebskranken nachweisbar sind (positiver Befund bei 7% - 53,8% der Patienten, je nach Carcinomtyp; LEHMANN, 1975) und die biochemisch sowie immunologisch mit der a.Ph. der menschlichen Placenta identisch sein sollen (FISHMAN u. Mit., 1968 u. 1971; FISHMAN, 1972; SASAKI u. FISHMAN, 1973 u. 1974; Übersichten: LEHMANN, 1975; LAMERZ u. FATEH-MOGHADAM, 1975). Das carcino-placentare Isoenzym kann aufgrund seines Verhaltens gegenüber Hemmsubstanzen in Unterfraktionen aufgetrennt werden, von denen das sog. Regan-Isoenzym wohl die bekannteste ist (FISHMAN, 1974). Die Synthese eines "ektopen Isoenzym" der a.Ph. in den Tumorzellen wird als das Resultat einer "Depression des Genoms" der Carcinomzellen aufgefaßt (FISHMAN, 1969). Das Regan-Isoenzym konnte auch in den Tumorzellen von Colonicarcinomen (MIYAYAMA u. Mit., 1976) und im Serum von Patienten mit Tumoren des Gastro-Intestinaltraktes nachgewiesen werden (LEHMANN, 1975 u. 1976).

In unseren Elektropherogrammen solider Carcinome mit hoher Aktivität der a.Ph. in der äußeren Zellmembran zeigt die mitt-

lere der drei Enzymfraktionen, die auch in der normalen Mukosa nachweisbar sind, eine sehr kräftige Reaktion. Diese Fraktion verhält sich gegenüber der Einwirkung von Hemmstoffen (z.B. L- Phenylalanin und L- Homoarginin) und nach Erwärmung der Elektrophoresegele auf 65° C wie das Regan-Isoenzym oder genauer ausgedrückt, wie der "mixed-Regan-and-non Regan-type" der a.Ph. (SASAKI u. FISHMAN, 1974). Die Aktivität dieser a.Ph. konnte mit elektronenmikroskopisch-histochemischen Methoden in Mitochondrien, im Golgiapparat, im endoplasmatischen Reticulum und in besonders hoher Aktivität in der äußeren Zellmembran - einschließlich der Mikrovilli - der Tumorzellen nachgewiesen werden (SASAKI u. FISHMAN, 1974).

Die Aktivität der s.Ph. ist in den Tumorzellen geringer als in den Epithelien der normalen Dickdarmschleimhaut. Histochemisch lassen sich teils feingranuläre, teils grobgranuläre spezifische Farbstoffpräzipitate in den Tumorzellen nachweisen. Wie elektronenmikroskopisch-histochemische Untersuchungen gezeigt haben, ist die Aktivität der s.Ph. der Tumorzellen in primären Lysosomen (feingranuläre Reaktion) sowie in Auto- und Heterolysosomen lokalisiert (vgl. HÖHN, 1977).

Die Entstehung autophager Vakuolen in den Epithelzellen der Dünndarmschleimhaut kann auch durch experimentelle Eingriffe am Dünndarm der Ratte induziert werden: z.B. nach Dünndarmresektion im verbliebenen Darmsegment (SCHÄFER u. HÖHN, 1975), nach Röntgenbestrahlung des Darmes (HUGON u. BORGERS, 1966; HUGON, 1976) u.a. Die Befunde deuten daraufhin, daß die Bildung autophager Vakuolen durch Zellschädigungen und durch den Einfluß einer verstärkten funktionellen Beanspruchung ausgelöst wird, in deren Verlauf die geschädigten und/oder entbehrlichen Zytoplasmabezirke durch Membranen von dem noch funktionstüchtigen Zytoplasma separiert und durch saure Hydrolasen abgebaut werden (vgl. PFEIFER, 1969 u. 1976). Das Auftreten intraepithelialer autophager Vakuolen ist demnach der morpho-

logische Ausdruck eines erhöhten "Zellverschleißes", wie dies besonders eindrucksvoll während der Fetalentwicklung der Ratte bei der Umwandlung des zu diesem Zeitpunkt noch mehrreihigen Darmepithels in ein einreihiges Epithel nachgewiesen werden konnte (GOSSRAU, 1975).

In diesem Zusammenhang ist auch die Frage von Bedeutung, ob in den Pherogrammen menschlicher Dickdarmtumoren - ähnlich wie bei der a.Ph. - besondere "tumorspezifische" Enzymfraktionen auftreten. Entsprechende elektrophoretische Untersuchungen von Tumorgewebe und Blutserum wurden insbesondere bei Patienten mit Prostatacarcinomen durchgeführt.

Nach REIF u. Mit. (1973) findet sich bei disk - elektrophoretischer Auftrennung der s.Ph. in Prostatacarcinomen ein Verlust von Aktivitätsfraktionen sowie eine Abnahme der Gesamtaktivität gegenüber dem normalen Prostatagewebe. Es konnten jedoch keine tumorspezifischen Fraktionen nachgewiesen werden. Hingegen beschreiben LI u. Mit. (1970) ein spezifisches Isoenzym der s.Ph. in isolierten Zellen der myeloischen Bildungsreihe bei myeloischer Leukämie. Histochemisch konnten KATAYAMA u. Mit. (1972) ein tartrat-resistentes Isoenzym der s.Ph. nachweisen, welches hauptsächlich in den Tumorzellen bei "leukämischer Reticuloendotheliose" nachgewiesen wurde. Der in den Tumorzellen histochemisch häufig nachweisbare Abfall der Aktivität der s.Ph. wird auf einen Ausreifungsdefekt der Tumorzellen zurückgeführt (PADYKULA, 1961; HODEL u. MEIER-RUGE, 1966; CZERNOBILSKY, 1968).

Bei der vorliegenden Untersuchung konnte in den Homogenaten der normalen Dickdarmschleimhaut nur eine Enzymfraktion von sehr schwacher Aktivität angefärbt werden. In den Tumoren tritt keine "neue" Enzymfraktion auf. Die hyperplastischen Polypen zeigen sowohl histochemisch wie auch elektrophoretisch ein gleichartiges Verhalten wie die normale Dickdarmschleimhaut. In den Adenomen, Adenocarcinomen und soliden Carcinomen zeigt die enzymatische Reaktion in den Elektrophoresegelen eine sehr un-

terschiedliche Intensität. In einzelnen Tumorhomogenaten - unabhängig von der Differenzierung der Tumoren - findet sich in den Elektrophoresegelelen keine wesentliche Aktivität, während sich in anderen Tumoren eine kräftig reagierende Fraktion der s.Ph. darstellt.

Die vorliegende Untersuchung der s.Ph. hat ergeben, daß in den Homogenaten der verschiedenen epithelialen Dickdarmtumoren keine "tumorspezifischen" quantitativen und/oder qualitativen Veränderungen der Aktivitätsfraktion der s.Ph. nachweisbar sind.

Histochemisch zeigen die LDH und MDH in den Tumorzellen der Adenome und Carcinome häufig eine gleich starke Reaktion wie in den Zylinderepithelien der Krypten; sie besitzen damit eine zumeist deutlich niedrigere, histochemisch faßbare Enzymaktivität wie die Zylinderepithelien an der Schleimhautoberfläche. Ein gleichartiges histochemisches Verhalten wie die oberflächlich gelegenen Zylinderepithelien der normalen Schleimhaut zeigen die Epithelzellen der hyperplastischen Polypen.

In Übereinstimmung mit den histochemischen und biochemischen Untersuchungsergebnissen an zahlreichen menschlichen und bei Versuchstieren induzierten Tumoren findet sich auch in den menschlichen Dickdarmtumoren der vorliegenden Arbeit eine hohe Aktivität der LDH. Bei disk-elektrophoretischer Auftrennung der LDH in Gewebshomogenaten fällt auf, daß in den Adenomen und Carcinomen die langsam wandernden LDH-Isoenzyme (LDH_5/LDH_4) dominieren, während die Isoenzyme LDH_1/LDH_2 nur noch sehr geringe Aktivitäten aufweisen oder überhaupt nicht mehr darstellbar sind. Ein gleichartiger Befund wurde bei zahlreichen menschlichen Tumoren (Kolon: PFLEIDERER u. WACHSMUTH, 1961; LANGVAD, 1968; Schilddrüse: OMI u. ANAN, 1970; Gehirn: STAVROU, 1971 u. 1975; u.a.) und experimentell erzeugten Tumoren beobachtet (Leber: FARRON u. Mit.,

1972; Uterus: SEKIYA u. Mit., 1973; Mamma: RICHARDS u. HILF, 1972; Gehirn: STAVROU, 1971 u. 1975; BROX, 1975; u.a.).

Die LDH in den Homogenaten hypoplastischer Polypen hingegen zeigt ein gleichartiges elektrophoretisches Verhalten wie die LDH in der normalen Dickdarmschleimhaut.

Während der Ontogenese des Menschen und auch der Versuchstiere ergibt sich in zahlreichen Organen ein Isoenzymbefund wie in den Tumorphomogenaten mit einem Aktivitätsmaximum der LDH_5/LDH_4 und einem Aktivitätsminimum von LDH_1/LDH_2 (Übersicht: KOWALEWSKI, 1972). Ein derartiges Aktivitätsverhalten zeigen auch die LDH - Isoenzyme im Darm fetaler und neugeborener Ratten (PAASCH, 1974). Erst einige Tage nach der Geburt entwickelt sich ein Isoenzymbild wie es bei adulten Tieren zu beobachten ist, mit einem Aktivitätsmaximum von LDH_3/LDH_4 sowie stets nachweisbarer Aktivität von LDH_1/LDH_2 . Auf die Frage, ob das dem fetalen LDH-Isoenzymen angegliche Isoenzymmuster in den experimentellen Dünndarmtumoren ("fetalism" der Tumoren; KNOX, 1976) Folge der besonderen metabolischen Verhältnisse in den Tumoren oder Folge einer veränderten Gen - Expression ist, kann an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden (vgl. CRISS, 1971; WEINHOUSE, 1972 u. 1976; MORRIS, 1972 u. 1975; Übersicht: KOWALEWSKI, 1972).

Die MDH-Elektropherogramme der Tumorphomogenate - unabhängig von der Differenzierung der Tumoren - weichen weder quantitativ noch qualitativ von den Elektropherogrammen der normalen Dickdarmschleimhaut ab. Lediglich die Aktivität variiert von Tumor zu Tumor, ohne eine Tumorspezifität erkennen zu lassen.

5. Zusammenfassung

Untersucht wurden 50 Dickdarmresektionspräparate aus der Chirurgischen Klinik Mainz mit benignen und malignen epithelialen Tumoren.

1. Histochemisch läßt sich die a.Ph. in normaler Dickdarmschleimhaut im Bürstensaum der an der Mukosaoberfläche gelegenen Zylinderepithelien nachweisen.

Die hyperplastischen Polypen zeigen eine gleiche histochemische Reaktion der a.Ph. wie die normale Dickdarmschleimhaut.

Bei den Adenomen und Adenocarcinomen färbt sich nur noch bei einzelnen wenigen Tumorzellen die apikale Zellmembran beim histochemischen Nachweis der a.Ph. an.

In den soliden Carcinomen zeigt der histochemische Nachweis der a.Ph. ein sehr unterschiedliches Bild, wobei sich Tumorzellen und Tumorstroma in wechselndem Ausmaß anfärben.

2. In der normalen Dickdarmmukosa können drei Fraktionen der a.Ph. mit nahezu gleich hoher Enzymaktivität bei der disk - elektrophoretischen Untersuchung aufgetrennt werden.

Bei den hyperplastischen Polypen zeigt die a.Ph. ein gleiches disk - elektrophoretisches Verhalten wie die a.Ph. bei der normalen Dickdarmschleimhaut.

Bei Adenomen, Adenocarcinomen und soliden Carcinomen können ebenfalls drei Fraktionen der a.Ph. elektrophoretisch nachgewiesen werden, jedoch häufig mit deutlicher Aktivitätsdominanz der mittleren Enzymfraktion.

3. Histochemisch läßt sich die s.Ph. in der normalen Dickdarmschleimhaut überwiegend in supra- und paranukleären Lysosomen der Krypten- und Oberflächenepithelien nachweisen.

Die hyperplastischen Polypen zeigen eine gleiche histochemische Reaktion der s.Ph. wie die normale Dickdarmschleimhaut.

Die Aktivität der s.Ph. der Adenome und Carcinome ist etwa gleich stark bzw. auch geringer als in den Kryptenepithelien der normalen Dickdarmschleimhaut. Im supranukleären Zytoplasma findet sich eine überwiegend feingranuläre Reaktion, bei einzelnen Tumorzellen auch gröbere Farbstoffpräzipitate.

4. In der normalen Dickdarmmukosa kann eine schwache Enzymfraktion der s.Ph. bei der disk - elektrophoretischen Untersuchung dargestellt werden.

In den Homogenaten von hyperplastischen Polypen zeigt sich ein Elektropherogramm wie bei der normalen Schleimhaut.

In den Adenomen und Carcinomen ist die elektrophoretisch nachweisbare Aktivität der s.Ph. stark ausgeprägt und entspricht hinsichtlich ihrer Lokalisation der Enzymfraktion der normalen Schleimhaut.

5. Histochemisch zeigt die LDH und MDH in der normalen Dickdarmmukosa weitgehend eine identische Lokalisation in den Formazan-Granula. Die Aktivität der LDH und MDH ist im Zylinderepithel an der Mukosaoberfläche höher als in den Kryptenepithelien und in den Becherzellen.

Das histochemische Verhalten der LDH und MDH bei hyperplastischen Polypen ist mit dem der normalen Dickdarmschleimhaut identisch.

Die Aktivität der LDH und MDH fällt in den Tumorzellen der Adenome, Adenocarcinome und soliden Carcinome gegenüber den Zylinderepithelien der normalen Schleimhaut zu meist deutlich ab.

6. In den Homogenaten der normalen Dickdarmschleimhaut kann die LDH disk - elektrophoretisch in fünf Isoenzyme aufgetrennt werden.

Ein gleichartiges elektrophoretisches Bild wie in der normalen Dickdarmschleimhaut zeigt auch die LDH in den Homogenaten von hyperplastischen Polypen.

In den Tumoren beobachtet man einen Verlust der Aktivität von LDH₁ und LDH₂, während die Aktivität von LDH₅ zunimmt.

7. Die MDH kann disk - elektrophoretisch in den Homogenaten der normalen Schleimhaut, der Polypen und Carcinome in zwei Isoenzyme aufgetrennt werden. Es lassen sich dabei keine tumorspezifischen Veränderungen erkennen.

6. Literaturverzeichnis

1. ALKEN, P., UNGEHEUER, E.: Die Bedeutung der Rektoskopie
in der Praxis, Dtsch. Ärztebl. 47, 3404 (1974).
2. ALLEN, J. M., HYNICK, G.: Localisation of alkaline phosphatases in gel matrices following electrophoresis.
J. Histochem. Cytochem. 11, 169 - 175 (1963).
3. ANDERSON, P. J., SONG, S. K., CHRISTOFF, N.:
The Cytochemistry of Acid Phosphatase
in Neural Tissue.
Proceedings of the IVth International Congress on Neuropathology, 1, 75 - 79,
Georg Thieme, Stuttgart (1962).
4. APPELLA, E., MARKET, C. L.: Dissociation of lactate dehydrogenase subunits with guanidine hydrochloride.
Bioch. Biophys. Res. Comm. 6, 171 (1961).
5. BARKA, T., ANDERSON, P. J.: Histochemical Methods for Acid Phosphatase using Hexazonium Pararosanilin as coupler.
J. Histochem. Cytochem. 10, 741 - 753 (1962).
6. BERG, J. W., HOWELL, M. A.: The geographic pathology of bowel cancer.
Cancer (Philad.) 34, 807 (1974).
7. BOKELMANN, D.: Das klinische Krebsregister. Möglichkeiten und Grenzen der zentralisierten interdisziplinären Krebstherapie, dargestellt am Beispiel des Colon- und Rectum - Carcinoms.
Habil.-Schrift, Med. Fakultät Heidelberg 1975.

8. BROX, G.: Disk-elektrophoretische und histochemische Untersuchung der sauren Phosphatase und Lactatdehydrogenase experimenteller Darmtumoren.
Med. Diss. 1975.
9. BUSSEY, H. J. R.: Age and cancer of the large intestine.
Thule International Symposia: Cancer and Aging, p. 203 (1968).
10. COOMBS, M. M., BHATT, T. S., CROFT, C. J.:
Correlation between carcinogenicity and chemical structure in cyclopentaphenanthrene.
Cancer Res. 33, 832 (1973).
11. CRISS, W. E.: A review of isozymes in cancer.
Cancer Res. 31, 1523 - 1542 (1971).
12. CZERNOBILSKY, B., TSOU, K.-C.: Adenocarcinoma, adenomas and polyps of the colon.
Cancer 21, 165 - 177 (1968).
13. DAVIS, B. J.: Disc-electrophoresis: II Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 - 427 (1964/65).
14. DESCHNER, E. E., LIPKIN, M.: Proliferative patterns in colonic mucosa in familial polyposis,
Cancer (Philad.) 35, 413 (1975).
15. DIETZ, A. A., LUBRANO, T.: Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc - electrophoresis.
Analyt. Biochem. 20, 246 - 257 (1967).

16. DIETZ, A. A., LUBRANO, T. und Mitarb.:
Disc-electrophoresis of lactate dehydrogenase isoenzymes,
Clin. Chem. Acta 27, 225 - 232 (1970).
17. FARRON, F., HSU, H. H. T., KNOX, W. E.:
Fetal-type isoenzymes in hepatic and non -
hepatic rat tumors.
Cancer Res. 32, 302 - 308 (1972).
18. FISHMAN, W. H., INGLIS, N. R., GREEN, S. und Mit.:
Immunology and biochemistry of Regan isoenzyme of alkaline phosphatase in human cancer.
Nature (Lond.) 219, 697 (1968).
19. FISHMAN, W. H.: Immunologic and biochemical approaches to
alkaline phosphatase isoenzyme analysis:
the Regan isoenzyme.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 166, 745 - 757 (1969).
20. FISHMAN, W. H., INGLIS, N. R., GREEN, S.: Regan isoenzyme:
a carcinoplacental antigen.
Cancer Res. 31, 1054 - 1057 (1971).
21. FISHMAN, W. H.: Carcinoplacental isoenzyme antigens.
Adv. Enzyme Regul. 11, 293 - 321 (1972).
22. FISHMAN, W. H.: Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes.
Amer. J. Med. 56, 617 - 650 (1974).
23. GÜSSNER, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode.
Untersuchungen zur Methodik und vergleichende Histotopik der Esterasen und Phosphatasen bei Wirbeltieren. Histochemie 1, 48 - 96 (1958).

24. GOMORI, G.: An improved histochemical technique for acid phosphatase.
Stain Technol. 25, 81 - 85 (1950).
25. GOSSRAU, R.: Die Lysosomen des Darmepithels.
Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology 51, 5.
Berlin - Heidelberg - New York: 1975
26. HAENSZEL, W., BERG, J. W., KURIHARA, M., LOCKE, F. B.:
Large - Bowel cancer in hawaiian japanese.
J. nat. Cancer Inst. 51, 1765 - 1799 (1973).
27. HARKNESS, D. R.: Studies on human placental alkaline phosphatase. II. Kinetic properties and studies on the apoenzyme.
Arch. Biochem. 126, 513 (1968).
28. HARRISON, D. D., WEBSTER, A. L.: Proximal to distal variations in enzymes of the rat intestine.
Biochem. Biophys. acta 244, 432 (1971).
29. HAYASHI, T., YATANI, R., APOSTOL, J., STEMMERMANN, G. N.:
Pathogenesis of hyperplastic polyps of the colon: a hypothesis based on ultrastructure and in vitro cell kinetics.
Gastroenterology 66, 347 (1974).
30. HILL, M. J.: Bacteria and the etiology of colonic cancer.
Cancer (Philad.) 34, 815 (1974).
31. HODEL, C., MEIER-RUGE, K. W.: Enzyme histochemical investigations on giant cells of specific and nonspecific granulation tissue and of malignant tumors.
Path. Europ. 1, 4, 425 - 432 (1966).

32. HÜHN, P., WALTHER, G., LEITHOFF, H.: Disc-elektrophoretische Differenzierung saurer Phosphatasen verschiedener Herkunft. Z. Rechtsmedizin 68, 129 - 137 (1971).
33. HÜHN, P. und Mit.: Regionale Unterschiede histochemisch nachweisbarer Enzymaktivitäten im Colon der Ratte unter funktionellen Aspekten.
Anat. Anz. Bd. 134, 327 - 338 (1973).
34. HÜHN, P.: Untersuchungen zur Morphologie und Morphogenese experimentell erzeugter Dünndarmtumore.
Habil.-Schrift, Med. Fakultät Mainz 1977.
35. HOLT, C.: Exper. Cell Res. 1, Suppl. 7, 1 (1959).
36. HUGON, J., BORGERS, M.: Ultrastructural localization of alkaline phosphatase activity in the absorbing cells of the duodenum of the mouse.
J. Histochem. 14, 629 - 640 (1966).
37. HUGON, J., BORGERS, M.: Fine structural localization of three lysosomal enzymes and nonspecific alkaline phosphatase in the villus of the human duodenum.
Gastroenterology 55, 608 - 618 (1968).
38. HUGON, J.: Intestinal ultrastructure after prolonged use of an elemental diet.
Strahlentherapie 151, 541 - 548 (1976).
39. KARASAKI, S.: Cell proliferation and subcellular localization of alkaline phosphatase activity in rat liver parenchyma during azo dye carcinogenesis. Cancer Res. 35, 482 - 491 (1975).

40. KASCHNITZ, R.: Die Disc-elektrophoretische Trennung von Isoenzymen der sauren Prostata-Phosphatase.
Z. f. Klin. Chem. 5,6, 3 (1967).
41. KATAYAMA, I. LI, C. Y., YAM, L. T.: Histochemical study of acid phosphatase isoenzyme in leukemic reticuloendotheliosis. Cancer 29, 1, 157 - 164 (1972).
42. KAYE, G. I., PASCAL, R. R., LANE, N.: The colonic pericryptal fibroblast sheat: replication, migration, and cytodifferentiation of a mesenchym cell system in adult tissue. III. Replication and differentiation in human hyperplastic and adenomatous polyps.
Gastroenterology 60, 515 (1971).
43. KNOX, W. E.: Enzyme patterns in fetal, adult and neoplastic rat tissues.
Basel - München - Paris: 1976.
44. KOUDSTAAL, J., MAKKINK, B., OVERDIEP, S. H.: Enzyme histochemical patterns in human tumours.
I. Hydrolytic enzymes in carcinoma of the colon and the breast.
Europ. J. Cancer 11, 105 - 109 (1975).
45. KOUDSTAAL, J., MAKKINK, B., OVERDIEP, S. H.: Enzyme histochemical patterns in human tumours.
II. Oxidoreductase in carcinoma of the colon and breast.
Europ. J. Cancer 11, 111 - 115 (1975).
46. KOWALEWSKI, S. L.: Biochemie und Klinik; Die Isoenzyme der Lactatdehydrogenase.
Georg Thieme, Stuttgart, (1972).

47. LAMERZ, R., FATEH-MOGHADAM, A.: Carcinofetale Antigene.
III. Andere carcinofetale Antigene.
Klin. Wschr. 53, 403 - 417 (1975).
48. LANE, N., KAPLAN, H., PASCAL, R. R.: Minute adenomatous
and hyperplastic polyps of the colon: divergent
patterns of epithelial growth with specific
associated mesenchymal changes.
Gastroenterology 60, 537 (1971).
49. LANGVAD, E.: Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in
bronchogenetic carcinoma.
Europ. J. Cancer 4, 107 (1968).
50. LANGVAD, E.: Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in
the tumor - bearing colon.
Int. J. Cancer 3, 17 (1968).
51. LEHMANN, F.-G.: Regan Isoenzym der alkalischen Phosphatase
im Serum bei malignen Tumoren.
Klin. Wschr. 53, 585 - 587 (1975).
52. LEHMANN, F.-G.: α_1 - Fetoprotein und Regan - Isoenzym
im Serum bei malignen Tumoren des Gastro-
intestinaltraktes.
Z. Gastroenterol. XIV, 268 - 269 (1976).
53. LI, C. Y., YAM, L. T., LAM, K. W.: Studies of acid phosphatase
isoenzyme in human leukocytes.
Demonstration of isoenzyme - cell specificity.
J. Histochem Cytochem. 18, 901 - 910 (1970).
54. LIPKIN, M.: Phase 1 and phase 2 proliferative lesions of
colonic epithelial cells in disease leading
to colonic cancer.
Cancer (Philad.) 34, 878 (1974).

55. MAGGI, V., WYATT, A. P.: Observations on an unusual enzyme distribution pattern in the colon of a case of familial polyposis with malignant changes. Gut 11, 319 - 322 (1970).
56. MARKERT, S., MØLLER, F.: Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic and species specific patterns. Proc. natl. Acad. Sci. (Wash.) 45, 753 (1959).
57. MARTIN, J. D., JR., SUTTON, G.: Present status of polyps of the colon. Classification and malignant potentials. Amer. Surg. 31, 551 (1965).
58. MAURER, H. R.: Disc-elektrophorese; Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid - Gel - Elektrophorese. De Gruyter, Berlin (1968).
59. MEIER-RUGE, W.: Incubation media for routine laboratory work on enzyme histochemistry. Beitr. Path., 144, 409 - 431 (1971).
60. MIYAYAMA, H., DOELLGAST, G., MEMOLI, V., GANDBHIR, L., FISHMAN, W. H.: Direct immunoperoxidase staining for Regan isoenzyme of alkaline phosphatase in human tumor tissues. Cancer 38, 1237 - 1246 (1976).
61. MORRIS, H. P.: Isoenzymes in selected hepatomas and some biological characteristics of a spectrum of transplantable hepatomas. Gann Monograph on Cancer Research 13, 95 - 106 (1972).
62. MORRIS, H. P.: Biological and biochemical characteristics of the transplantable hepatomas. Handbuch der allgemeinen Pathologie Bd. VI/ Teil 6: Geschwülste - Tumors, 277 - 334 Berlin - Heidelberg - New York: 1975

63. MORSON, B. C.: Precancerous lesions of the colon and rectum.
Classification and controversial issues.
J. Amer. med. Ass. 179, 316 (1962).
64. MORSON, B. C.: Some peculiarities in the histology of intestinal
polyps. Dis. Colon, Rect. 5, 337 (1962).
65. MORSON, B. C., BUSSEY, H. J. R.: Predisposing causes of in-
testinal cancer. In: Curr. Probl. Surg.
(Year Book) Chicago 1970.
66. MORSON, B. C.: The polyp - cancer sequence in the large
bowel. Proc. roy. Soc. Med. 67, 451 (1974).
67. MORSON, B. C.: Evolution of cancer of the colon and rectum.
Cancer (Philad.) 34, 845 (1974).
68. MOSS, D. W.: Alkaline phosphatase isoenzymes.
Enzyme 20, 20 - 34 (1975).
69. MUTO, T., BUSSEY, H. J. R., MORSON, B. C.: The evolution of
cancer of the colon and rectum.
Cancer (Philad.) 36, 2251 (1975).
70. NACHLAS, M., WALKES, D., SELIGMANN, A.: A histochemical method
for demonstration of diphosphopyridine nucleotide
diaphorase.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 29 - 38 (1958).
71. OMI, Y., ANAN, F. K.: Lactate dehydrogenase isoenzymes of
thyroid tissue in various thyroid gland diseases.
Enzymol. Biol. Clin. 11, 224 (1970).
72. ORNSTEIN, L.: Disc-elektrophoresis. I. Background and theory.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321 (1964).

73. OTTO, H. F., WINKLER, R., HEITMANN, C.:
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Morphogenese Nitrosamin-induzierter colorectaler Tumoren.
Z. Krebsforschung 87, 333 - 342 (1976).
74. PAASCH, W.: Disk-elektrophoretische Untersuchungen zur postnatalen Differenzierung der Laktatdehydrogenase und der sauren Phosphatase im Darm der Ratte.
Med. Diss. Mainz 1975
75. PADYKULA, H. A., STRAUSS, F. W., LADMAN, A. J., GARDENER, F. H.
Amorphology and histochemical analysis of the human jejunal epithelium in non tropical sprue
Gastroenterology 40, 735 - 765 (1961).
76. PEARSE, A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and Applied.
Third edition. Band I und II
London: 1968 und 1972
77. PFEIFER, U.: Kombinierte elektronenmikroskopische Darstellung der Arylsulfatase und der sauren Phosphatase in Lysosomen des Nierentubulus.
Histochemie 17, 284 - 292 (1969).
78. PFEIFER, U.: Lysosomen und Autophagie.
Verh. dtsch. Ges. Path. 60, 28 - 64 (1976).
79. PFLEIDERER, G., WACHSMUTH, E. D.: Alters- und funktionsabhängige Differenzierung der Laktatdehydrogenase menschlicher Organe.
Biochem 2. 334, 185 (1961).
80. POTET, F., SAULLARD, J.: Polyps of the rectum and colon.
Gut. 12, 468 (1971).

81. RAYMOND, S., WEINTRAUB, L.: Acrylamid gel as an supporting medium for zone electrophoresis.
Science, 130, 711 (1959).
82. REDDY, B. S.: Role of bile metabolites in colon carcinogenesis, Animal models, Cancer (Philad.) 36, 2401 (1975).
83. REIF, A. E., SCHLESINGER, R. M., FISH, C. A., ROBINSON, C. M.: Acid phosphatase isoenzymes in cancer of the prostate. Cancer, 31, 3, 689 - 699 (1973).
84. RICHARDS, A. H., HILF, R.: Effect of estrogen administration on glucose - 6 - phosphatase dehydrogenase and lactate dehydrogenase isoenzymes in rodent mammary tumors and normal mammary gland.
Cancer Res. 32, 611 - 616 (1972).
85. SASAKI, M., FISHMAN, W. H.: Ultrastructural studies on Regan and non-Regan isoenzymes of the alkaline phosphatase in human ovarian cancer cells.
Cancer Res. 33, 3008 - 3018 (1973).
86. SASAKI, M., FISHMAN, W. H.: Ultrastructural studies on Regan and non-Regan isoenzymes of alkaline phosphatase in human tumors.
In: Electron microscopy and cytochemistry, 59 - 62
Amsterdam - London - New York: 1974
87. SCHÄFER, A., HÖHN, P.: Funktionelle Morphologie der Darm-schleimhaut. Struktur und Enzymmuster bei der Ratte.
Gastroenterologie und Stoffwechsel, Bd. 8
Stuttgart: 1975

88. SEKIYA, S., KIKUCHI, Y., TAKAMIZAWA, H.: High - and low - tumorigenic culture lines of rat uterine adenocarcinoma and their isoenzyme patterns of lactate dehydrogenase and hexokinase.
Cancer Res. 33, 3324 - 3329 (1973).
89. SILVERSTEIN, E., SULEBELE, G.: Equilibrium kinetic study of the mechanism of mitochondrial and supernatant malate dehydrogenase of bovine heart.
Biochem. biophys. Acta 185, 297 - 304 (1969).
90. SHEPHERD, J. M., JONES, J. S. P.: Adenocarcinoma of the large bowel. Brit. J. Cancer 25, 680 (1971).
91. SPERRY, J. F., SALYERS, A. A., WILKINS, T. D.: Fecal long chain fatty acids and colon cancer risk.,
Lipids 11, 637 - 639 (1976).
92. STAVROU, D.: Zur vergleichenden Pathologie der Tumoren des Nervensystems. Eine morphologische und enzym-histochemische Studie an spontanen bzw. experimentellen Tumoren des Nervensystems verschiedener Tierspecies sowie vergleichbarer Tumoren des Menschen.
Zbl. Vet. Med. A, 18, 585 - 628 (1971).
93. STAVROU, D.: Biochemie und Histochemie experimenteller Hirntumoren.
In: H. D. Menzel u. S. Ivankokovic
Experimentelle Erzeugung von Tumoren des Nervensystems. Bd. VI / Teil 6: Geschwülste - Tumors III, 94 - 103, Berlin - Heidelberg - New York: 1975

94. WATANABE, R., FISHMAN, W. H.: Application of the stereo-specific inhibitor L-phenylalanine to the enzymmorphology of intestinal alkaline phosphatase.
J. Histochem. Cytochem. 12, 252 - 260 (1964).
95. WEINHOUSE, S.: Glycolysis, respiration and anomalous gene expression in experimental hepatomas: G. H. A. Clowes memorial lecture.
Cancer Res. 32, 2007 - 2016 (1972).
96. WEINHOUSE, S.: The Warburg hypothesis fifty years later,
Z. Krebsforsch. 87, 115 - 126 (1976).
97. WIEBECKE, B., LÖHRS, U., BRANDTS, A., EDER, M.:
Vergleichende tierexperimentelle und biopsische Untersuchungen zur Morphogenese der Dickdarmpolypen.
Verh. dtsch. Ges. Path. 53, 239 (1969).
98. WIEBECKE, B., BRANDTS, A., EDER, M.: Epithelial proliferation and morphogenesis of hyperplastic, adenomatous and villous polyps of the human colon. Virchow Arch. A. Path. Anat. and Histol. 364, 35 (1974).
99. WILLIAMS, D. E., REISFELD, R. A.: Disc-electrophoresis in polyacrylamide gels: Extension to new conditions of pH and puffer.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 2, 373 (1964).
100. WOLFMAN, E. F., ASTLER, V. B., COLLIER, F. A.: Mucoid adenocarcinoma of the colon and rectum.
Surgery 42, 846 (1957).

101. WYNDER, E. L., REDDY, B. S.: Studies of large bowel cancer: human leads to experimental application. J. nat. Cancer Inst. 50, 1099 - 1106 (1973).
102. WYNDER, E. L., REDDY, B. S.: Metabolic epidemiology of colorectal cancer. Cancer (Philad.) 34, 801 (1974).

7. Lebenslauf

Am 8.4.1949 wurde ich, Hans Peter Wildmeister, als zweites Kind des Architekten Hans Wildmeister und seiner Ehefrau Magdalene, geborene Martinek, in Düsseldorf geboren.

Im Anschluß an eine fünfjährige Volksschulzeit besuchte ich von 1960 bis 1968 das staatlich anerkannte neusprachliche Gymnasium Garenfeld in Garenfeld/Hagen, wo ich am 24.5.1968 die Reifeprüfung ablegte.

Es schloß sich eine einjährige Ableistung des Grundwehrdienstes an.

Im Wintersemester 1969/70 habe ich mich an der Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität Bonn als stud. rer. nat. für die Fächer Physik und Chemie immatrikuliert.

Zum Wintersemester 1970/71 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken. Am Ende des Wintersemesters 1970/71 legte ich die naturwissenschaftliche, und im Sommersemester 1973 die ärztliche Vorprüfung ab.

Im Wintersemester 1973/74 setzte ich - nach der Eheschließung mit der Lehrerin Ilona Wildmeister, geborene Fritzsche - mein Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz fort, wo ich im Wintersemester 1976/77 meine ärztliche Prüfung ablegte.

Im Februar 1977 trat ich meine Medizinalassistentenstelle am Pathologischen Institut der Universität Mainz an. Von August 1977 bis März 1978 war ich als Medizinalassistent in der chirurgischen und inneren Abteilung des Heilig-Geist-Hospitals in Kempen tätig, wo ich auch zur Zeit - nach Erhalt meiner Approbation am 1. April 1978 - angestellt bin.

Herrn Prof. Dr. P. Höhn meinen aufrichtigen Dank
für die Überlassung des Themas und die immer hilf-
reiche Unterstützung.

